IV CONGRESO INTERNACIONAL
CIENCIA Y TECNOLOGÍA de los Alimentos

14, 15 Y 16 DE NOVIEMBRE DE 2012

Córdoba - Argentina

Libro de trabajos completos

Conservación y almacenamiento | Biotecnología | Inocuidad

UNC Universidad Nacional de Córdoba
1613 - 2013 400 AÑOS
Ministerio de Ciencia y Tecnología
Gobierno de la Provincia de Córdoba

Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba

Universidad Nacional de Córdoba

IV Congreso Internacional

Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Noviembre de 2012

Córdoba - Argentina

Libro de trabajos completos

Conservación y almacenamiento | Biotecnología | Inocuidad

Dra. Alicia Aguirre (Coordinadora), Dra. Cecilia Álvarez Igarzábal,
MSc. Andrea Marín, Dra. María Angélica Perillo, Dra. Miriam Strumia

IV Congreso Internacional Ciencia y Tecnología de los Alimentos : libro de trabajos completos : conservación y almacenamiento, biotecnología, inocuidad / Alicia Aguirre ... [et.al.] ; edición literaria a cargo de Miriam Strumia ... [et.al.]. - 1a ed. - Córdoba : Universidad Nacional de Córdoba, 2013.

E-Book.

ISBN 978-950-33-1072-4

1. Ingeniería de Alimentos. 2. Tecnología de Alimentos. 3. Actas de Congresos. I. Aguirre, Alicia II. Strumia, Miriam, ed. lit.

CDD 664.028

Fecha de catalogación: 25/09/2013

Editores:

Dra. Alicia Aguirre, ICYTAC, UNC-CONICET, FCEFyN-Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. Cecilia Álvarez Igarzábal, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

MSc. Andrea Marín, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. María Angélica Perillo, IIBYT (CONICET-UNC)- ICTA, FCEFyN, UNC. Dra. Miriam Strumia, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Autoridades

GOBIERNO DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA

Dr. José Manuel de La Sota
Gobernador

Cra. Alicia Pregno
Vicegobernadora

Ing. Roger Illanes
Ministro de Ciencia y Tecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Dra. S. Carolina Scotto
Rectora

Dra. Hebe S. Goldenhersch
Vicerrectora

Dr. Alberto Edel León
Secretario de Ciencia y Tecnología

PRESIDENCIA de CICyTAC 2012

Ing. Hugo Dellavedova
Secretario de Innovación y Vinculación Tecnológica
Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba

COMITÉ ORGANIZADOR

Coordinadora

Dra. Victoria Rosati
Direccion de Vinculación Tecnológica, MinCyT Córdoba

Ing. Jorge Bertozzi
Ministerio de Ciencia y Tecnología, Córdoba

Ing. Rubén Baccifava
Ministerio de Ciencia y Tecnología, Córdoba

Mgter. Natalia Paola Masferrer
Dirección de Vinculación Tecnológica, MinCyT Córdoba

Dr. Alberto Edel León
SECyT-Universidad Nacional de Córdoba

Dra. Mirtha Nassetta
ISEA, Universidad Nacional de Córdoba

Dr. Pablo Daniel Ribotta
ISIDSA-Universidad Nacional de Córdoba

Dr. Daniel Wunderlin
ISIDSA-Universidad Nacional de Córdoba

Dr. Rafael Borneo
CEPROCOR, MinCyT Córdoba

Dr. Marcelo Rosmini
Secretaría de Vinculación, Universidad Católica de Córdoba

Dra. Gabriela Pérez
ISIDSA-Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba

Bioq. Nancy Passalacqua
CEPROCOR, MinCyT

Lic. Vanesa Scarlatta
Secretaria de Alimentos, MAGAyPAF

Ing. Marcelo Cejas
Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Villa María

Ing. Javier Saldarini
Univerisdad Tecnológica Nacional, Facultad Regional San Francisco

Dra. Gabriela Gallo
Universidad Nacional Villa María

Dra. Cecilia Frigerio
Universidad Nacional de Río Cuarto

COMITÉ CIENTÍFICO

Coordinador

Dr. Alberto Edel León
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dr. Manuel Gómez Pallares
Universidad de Valladolid, España

Dr. Abel López
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. Miriam Strumia
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dr. Alain LeBail
ENITIAA, Nantes, Francia

Dr. Carlos Guzmán
ICTA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dr. Carmen Tadini
Universidade de São Paulo, Brazil

Dr. Daniel Wunderlin
ISIDSA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dr. Eduardo Romero
Universidad Tecnológica Nacional, Villa María, Argentina

Dr. Harry Levine
Food Polymer Science Consultancy, New Jersey, USA

Dr. João Batista de Almeida e Silva
Universidade de São Paulo, Brazil

Dra. María Eugenia Steffolani
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dr. José Miguel Bastías Montes
Universidad de Bío Bío-Chile

Dr. Luis Arturo Bello Pérez
Instituto Politécnico Nacional, México

Dra. Cristina Ferrero
CIDCA, La Plata. Argentina

Dr. Marcelo Rosmini
Universidad Católica de Córdoba, Argentina

Dr. Mario Tapia
Universidad Nacional Técnica del Altiplano, Perú

Dr. Pablo Ribotta
ISIDSA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dr. Paul Singh
University of California, Davis, USA

Dr. Rafael Borneo
CEPROCOR, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Córdoba, Argentina

Dr. Ricardo Ociel Muñoz Fariña
Universidad Austral de Chile

Dr. Rolando Pécora
Universidad Nacional de Villa María, Argentina

Dr. Sam Saguy
The Hebrew University of Jerusalem, Israel

Dra. Alfonsina Andreatta
Universidad Tecnológica Nacional, San Francisco, Argentina

Dra. Cecilia Penci
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. Cecilia Puppo
CIDCA, La Plata. Argentina

Bioq. Nancy Passalacqua
CEPROCOR, Ministerio Ciencia y Tecnología, Córdoba, Argentina

Dr. Edgardo Calandri
ICTA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. Gabriela Pérez
ISIDSA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. Isabel Brutti
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. María Angélica Perillo
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. Mariana Montenegro
Universidad Tecnológica Nacional, Villa María, Argentina.

Prof. Mariane Lutz Riquelme.
CIDAF, Valparaíso, Chile.

Dra. Cecilia Frigerio.
Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.

Dra. Adriana Mauri.
CIDCA. La Plata, Argentina.

Dra. Cecilia Álvarez Igarzábal.
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Dra. Cristina Martínez
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. Marie De Lamballerie-Anton
ENITIAA, Nantes, Francia

Dra. Natalia Podio
ISIDSA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. Marcela Martínez
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. Myriam Fernández Ortega
Universidad de Panamá

Dra. Patricia Aguirre
Universidad Nacional de San Martín, Argentina

Dra. Ruth Pedroza Islas
Universidad Iberoamericana, México

Dra. Lorena Sciarini
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. Silvana Martini
Utah State University, USA

Dra. Susana Bettera
Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

Dra. Verónica Baroni
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. Verónica Nicolau
Universidad Tecnológica Nacional, San Francisco, Argentina

Dra. Paola Roccia
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Mg. Susana Garnero
Universidad Tecnológica Nacional, San Francisco, Argentina

Mgter. Fernando Bonaterra
Universidad Tecnológica Nacional, Villa María, Argentina

MSc. Andrea Marín
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. Alicia Aguirre
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. María Dolores Pérez Cabrejas
Universidad de Zaragoza, España

COMITÉ TECNOLÓGICO

Coordinadora

Mgter. Natalia Masferrer
Dirección de Vinculación Tecnológica, MinCyT Córdoba

Dr. Gabriel Raya Tonetti
ARCOR S.A.I.C.

Ing. Armando Mariani
DIMAX

Ing. Carlos Di Tella
PLASTICOS DISE

Ing. Carlos Simbron
GEORGALOS

Ing. Dimas Vicentin
SANCOR

Ing. Jorge Bertozzi
Ministerio de Ciencia y Tecnología
Córdoba

Ing. Javier Verde
Helacor S.A.

Ing. Marcela Borgogno
MANFREY

Ing. Marisa Fernández
QUICKFOODS

Ing. Ricardo Cravero
ECISA SA

Ing. Roca
Frigorífico Logros y Vare S.R.L.

Mg. José Garnero
LA PIAMONTESA

Ing. Violeta Silbert
INTI Córdoba

Mg. Silvina Faillaci
Ministerio de Ciencia y Tecnología
Córdoba

Biol. Andrea Alessio Lax
CEPROCOR MinCyT, Córdoba

Ing. Rubén Luis Baccifava
Ministerio de Ciencia y Tecnología
Córdoba

Lic. Vanesa Scarlatta
Secretaria de Alimentos, Ministerio de Agricultura, Ganadería, Alimentos y Producción Agropecuaria Familiar

Dr. Daniel Wunderlin
Universidad Nacional de Córdoba

Dr. Pablo Ribotta
Universidad Nacional de Córdoba

Lic. Silvina Ghione
GRUPO DULCOR

SECRETARIA DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL

Coordinadora

Mgter. Maribel Gonzalez
Cooperación Internacional, MinCyT Córdoba

Trad. Dolores Hernández
Universidad Nacional de Córdoba

Mgter. Gerardo Echeverría
Universidad Nacional de Villa María

SECRETARÍA TÉCNICA

As. Guillermo Ferreyra
MinCyT Cba.

As. María Cecilia Collino
MinCyT Cba.

Lic. Irene Schübel
Comunicación y Prensa. MinCyT Cba.

Lic. Gastón Dunayevich
Comunicación y Prensa. MinCyT Cba.

Lic. Ana Almada
Comunicación y Prensa. MinCyT Cba.

Sr. Ramón Roque Zapata
Comunicación y Prensa. MinCyT Cba.

Lic. Daniel Moyano
Comunicación y Prensa. MinCyT Cba.

Sr. Bernardo Pla
Comunicación y Prensa. MinCyT Cba.

Sr. Sergio Rubino
Comunicación y Prensa. MinCyT Cba.

Carina Vargas
UCC - Sección Contaduría - Contabilidad y Presupuesto

MBA Luis Alvarez Chiabo
UCC - Sección Contaduría - Contabilidad y Presupuesto

Federico De Giovanni
UCC - Sección Contaduría - Contabilidad y Presupuesto

Cra. María Virginia Ares
UCC - Sección Contaduría - Contabilidad y Presupuesto

Cra. Vanina Beatriz Cañete
UCC - Sección Contaduría - Contabilidad y Presupuesto

Maryori Gonzalez
UCC - Sección Contaduría - Contabilidad y Presupuesto

Nancy Bascary
UCC - Sección Contaduría - Contabilidad y Presupuesto

Ema Pais
UCC - Sección Contaduría - Contabilidad y Presupuesto

Lic. Cecilia Menendez
UCC - Sección Contaduría - Contabilidad y Presupuesto

Marcela Moroni
UCC - Sección Contaduría - Contabilidad y Presupuesto

Valeria Toledo
UCC - Sección Contaduría - Contabilidad y Presupuesto

Lic. Romina Rova Bagilet
UCC - Sección Contaduría - Contabilidad y Presupuesto

Hector José Vaca
UCC - Sección Contaduría - Contabilidad y Presupuesto

Emilce Fabiani
MinCyT Cba.

INDICE

Conservación y almacenamiento

Agazzi L. 2
Aguirre, A. 8
Arrieta M.P. 16
Boiero L. 22
Bonafede M. 31
Busch V. M.,* 36
Céliz G. 44
Fernandez V. 51
Guiotto E.N. 59
López O. 67
López Córdoba A.F. 76
Magariño M. 83
Maldonado S. 92
Márquez A.L. 98
Michaluk, A. 105
Musso Y.S. 112
Olivares M.L. 121
Ollé Resa, C. P 126
Pérez C.D. 133
Rubinstein A. 139
Trela V.D. 147
Vasco M.F.1 156
Villarruel S. Rivero 165

Biotecnología

Apesteguía A 173
Brousse M.M 181
Estela-Escalante, WD. 188
Ferreira S.P. 198
Ferreira S.P. 204
Lupi G. J 210
Machado 221
Machado. 228
Miletti A. E. 235
Ledesma D., ... 241
Pacheco C. 249
Paludo M.P. 259
Reis D.F. 265
Reis D.F. 272
Ribeiro VA, ... 279
Rodríguez De Marco ME 284
Zubreski E.R. 290

Inocuidad

Mercedes Montserrat 298
Nigro J.A. 305
Silveira M.F. 312

Conservación y almacenamiento

Influencia de las propiedades del envase en el desarrollo de colores anómalos en carnes

Agazzi L.[1], Strumia M.[1,2], Toselli R.[1, 3]

1. Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Químicas - UNC, Argentina.
2. IMBIV-CONICET
3. Centro de Química Aplicada (CEQUIMAP). Facultad de Ciencias Químicas-UNC, Argentina.

Resumen: En el presente trabajo se presentan los estudios comparativos de dos películas comerciales multicapa, identificadas como "I" y "II" usadas para la envoltura y conservación de carnes al vacío. Se realizaron diferentes estudios físico-químicos y microbiológicos con el objetivo de analizar el comportamiento de las mismas en función del tiempo. En la muestra I se lograron identificar los siguientes materiales: Polietileno (PE), Policloruro de Vinilo (PVC) y Copolímero de Etileno:Vinil acetato (EVA); en la muestra II se encontraron dos capas de PE y Polietilentereftalato (PET). La carne envasada con la película II mostró elevadas poblaciones de microorganismos a partir del día 30 de control y un pronunciado pardeamiento antes del día 60 de almacenamiento. Ambos materiales son de alta barrera a oxigeno (O_2) y vapor de agua, pero la película I mostró menor permeabilidad al vapor de agua y mayor permeabilidad al O_2; inverso a los valores de permeabilidad encontrados en la muestra II. La menor presión parcial de oxígeno dentro de la película II, generaría condiciones favorables a la formación de metamioglobina con el consiguiente pardeamiento de la carne, lo cual fue observado en forma más temprana en la muestra envasada en dicha película. Como conclusión, la película multicapa I resultó mejor para este tipo de envasado que la película II. Este hecho se puede atribuir a que el envase I reúne las propiedades barreras óptimas para tal fin, probablemente conferidas por la presencia de PVC.

Palabras Claves: envases multicapa, propiedades barrera, vacío, carnes.

Abstract: In this work we present comparative studies of two multilayer films, identified as "I" and "II". Different studies were carried out like as physicochemical and microbiological parameters with the aim to know the efficiency of these with the time. In sample I, following materials were identified: polyethylene, polyvinyl chloride and ethylenevinyl acetate copolymer (EVA); in sample II, polyethylene and polyethylene terephthalate (PET). The meat packaged with the film II showed high populations of microorganisms from the 30th day of control and a pronounced browning before day 60 of storage. This darkening was not observed in samples packaged with the film I in the aforementioned control times. A decisive role played the barrier properties to oxygen and water vapor of the polymers that make up each container. Both materials are of high barrier to the gases, but film II showed lower permeability to oxygen and a bigger permeability to vapor water in relation to material I. The lower partial oxygen pressure inside the package with the film II, would generate favorable conditions to the formation of metamyoglobine with a consequent browning of the meat packaged with it, 60 days before the darkening was observed in the sample wrapped with the film I. As conclusion, the multilayer film I is a better option for this type of packaging that film II. This can be attributed to the fact, that container I satisfied the optimum barrier properties for the purpose.

Keywords: multilayer packaging, barrier properties, vacuum packaging, meat.

INTRODUCCION

La carne es un producto alimenticio que suele almacenarse y comercializarse envasada y el material del envase juega un rol sumamente importante cuando se trata de productos de exportación. Los materiales de envasado más comúnmente usados por la industria alimentaria varían desde los muy impermeables, empleados para el envasado al vacío, a los muy permeables, y desde los opacos a los trasparentes (Scheichl R., et al. 2005). Su materia prima está constituida por compuestos simples, como el polietileno (PE) y el poli cloruro de vinilo (PVC), o por componentes múltiples (mezcla de varios polímeros). Las carnes frescas se envasan generalmente en películas permeables al oxígeno con el fin de conservar el color rojo brillante característico de la carne fresca.

El color de la carne depende fundamentalmente del estado de oxidorreducción (OR) del átomo de hierro del grupo hemo de la mioglobina y de la fijación de O_2. A elevadas presiones parciales de oxígeno se favorece la formación de la **oximioglobina (color rojo)** y a bajas presiones se favorece la *oxidación* del átomo de Fe,

formándose **metamioglobina (color pardo)**. Este último caso se suele presentar en el envasado de carnes al vacío ya que se utilizan envases muy poco permeables al oxígeno. Este hecho puede producir problemas de comercialización, debido a que el consumidor asocia este color con el producido en la carne durante un largo período de almacenamiento (Mancini R.A., Hunt M.C., 2005).

La disponibilidad de oxígeno en el interior del envase ejerce una marcada influencia en la flora microbiana. Por lo tanto, el color de la carne envasada es el resultado de una compleja interacción de factores que incluyen, el estado de óxido-reducción de sus pigmentos propios, la actividad metabólica de la flora microbiana asociada, los cambios en la composición predominante de dicha flora, las características de los materiales empleados en el envasado, la composición de la atmósfera en el interior del envase y las condiciones de almacenamiento del producto, entre otros.

La carne fresca es a menudo presentada en bandejas de poliestireno y envasada con películas permeables al oxígeno. Este envase permite la oxigenación rápida del pigmento y el desarrollo de un color rojo deseable, pero la decoloración se produce dentro de los primeros 7 días (Madhavi D. L., Carpenter, C. E., 1993) o después de 6 a 9 días de almacenamiento en dicho material (Albertí P. et al., 2005; Ripoll G. et al., 2007; Sanz, A. et al., 2011). Altas concentraciones de oxigeno atmosférico promueven la formación de oximioglobina, la forma de color rojo cereza de la mioglobina, sin embargo, pueden repercutir negativamente sobre la oxidación de lípidos y la decoloración del músculo (Jeremiah, 2001). Films anóxicos mantienen la mioglobina en su forma reducida y aumentan la vida útil de la carne, sin embargo, el color púrpura es menos conveniente para los consumidores, debido a que da la impresión de deterioro, que el color rojo de la oximioglobina. Debido a que los consumidores están menos familiarizados con este color, la carne suele estar expuesta al oxígeno antes de ser colocadas en las estanterías del local de venta al público (Ripoll G. et al., 2013).

El objetivo general planteado en el presente trabajo, es realizar un estudio comparativo de dos envases plásticos multicapa de origen comercial, analizando las principales causas que generan el desarrollo de colores anómalos en carnes envasadas al vacío. En este caso particular, se propuso identificar los aspectos más relevantes que afectan el grado de conservación y las características organolépticas de la carne envasada, estudiando los parámetros de calidad microbiológica y fisicoquímicos de las carnes envasadas y las propiedades barrera y mecánicas del material del envase.

MATERIALES Y METODOS

Las muestras de carnes fueron adquiridas en un frigorífico de la ciudad de La Pampa, los materiales plásticos (identificados como I y II) fueron donados por una empresa del medio local y usados para envasar al vacío los bloques de carne. A partir del día de envasado (D_0), las muestras se conservaron a una temperatura de (2,0 ± 0,5) ºC. Los diferentes parámetros de estudio fueron evaluados a intervalos regulares de 30 días (D_0, D_{30}, D_{60}, D_{90} y D_{120})

Los parámetros fisicoquímicos estudiados en la carne fueron: pH, acidez, actividad de agua (a_w), potencial redox y humedad, empleando las siguientes técnicas de trabajos:

Se determinó la humedad de las muestras de carne envasada por el método informado en la AOAC, para lo cual se secó una porción de muestra en la estufa durante 16 a 18 horas a 100 – 102 ºC. (AOAC Official Method 950.46)

La actividad de agua (a_w), se determinó con el método de la celulosa microcristalina (Vos P.T. y Labuza T.P., 1974). Este se basa en calcular la cantidad de agua adsorbida por una cantidad de celulosa microcristalina (compuesto higroscópico) en equilibrio con el vapor del alimento, en un recipiente cerrado a una determinada temperatura.

La acidez de la carne, expresada como ácido láctico, se midió mediante una adaptación de los métodos propuestos por la AOAC para determinar la acidez de los alimentos. Todos estos métodos se basan en una titulación potenciométrica (ácido base) con una solución alcalina de hidróxido de sodio sobre una solución preparada a partir del macerado de trozos de la muestra de carne y diluida en agua destilada. (AOAC Official Method 920.174 y 920.43. 2005)

El pH de la carne se determinó a través de una medición potenciométrica sobre la muestra, utilizando un pH-metro Sartorius (Professional Meter PP-20) y un electrodo de pH de membrana de vidrio (PYP11 Sartorius A102111013).

El potencial de oxidación-reducción de la carne se estudió utilizando un electrodo de medida de potencial redox de platino, marca Hanna.

Tanto el potencial redox como el pH se midieron directamente sobre el bloque de carne sin ningún tratamiento previo.
La evolución de la flora microbiana se evaluó a través de la determinación, en cada punto de control, es decir para los días: 0, 30, 60, 90 y 120, del recuento del siguiente grupo de bacterias: Bacterias heterótrofas mesófilas, Enterobacterias, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Anaerobios sulfitorreductores, *Pseudomonas* sp.; flora psicrótrofa, flora láctica y mohos y levaduras (Forsythe S.J., Hayes P.R. 2007). Para todas estas determinaciones se utilizó como metodología de referencia la establecida por la FDA-BAM (AOAC) (Bacteriological Analytical Manual, FDA-BAM) y el CMMEF (APHA) (Downes F. P., Ito K. 2001).
En las muestras de material plástico se realizó la identificación química estructural, se midió el espesor, propiedades mecánicas y permeabilidad a oxígeno y vapor de agua, usando las siguientes técnicas y equipos:
La identificación estructural de cada una de las capas que formaban las películas plásticas se realizó por espectroscopía de Reflectancia Total Atenuada (ATR), empleando un espectrómetro Nicolet 5-5X C FTIR. Las capas que formaban parte del envase fueron separadas luego de sumergir el material 24 horas en acetato de etilo.
El espesor de las películas se midió con un micrómetro Schwyz modelo ESP1-0001PLA.
Las propiedades mecánicas de los plásticos utilizados como envases fueron determinadas de acuerdo a una norma ASTM (ASTM (D882-02)), usando un equipo Instron Universal Testing Machine (model 3342, Norwood, MA, USA) equipado con una celda de 500 N de capacidad. Se ensayaron 8 probetas (9 x 111 mm) de cada film utilizando una separación de agarre inicial de 110 mm y una velocidad del cabezal de 0,5 mm/s (Alvarez Igarzabal C.I., et al. 2011).
La permeabilidad al vapor de agua se midió siguiendo una norma ASTM (ASTM (E96M-10)) mediante del método del desecante. Los ensayos fueron realizados a una temperatura constante de 25ºC durante un tiempo de contacto de 22 días. (Alvarez Igarzabal C.I., et al. 2011).
La permeabilidad al oxígeno se midió en el equipo PLASTIMET S.A.I.C (Modelo PPG 2, Ind. Arg.).

RESULTADOS Y DISCUSION

Con relación a los parámetros fisicoquímicos considerados (a_w, humedad, pH, potencial redox y acidez) puede decirse en base a los resultados obtenidos que, independientemente del material de envasado utilizado, el potencial redox tiende a hacerse más negativo, es decir que se generan condiciones reductoras por el consumo de oxígeno, y la acidez aumenta a lo largo del período de almacenamiento. Este aumento puede estar vinculado a la acumulación de CO_2, que conlleva a la formación de ácido carbónico, y/o a la acumulación de ácidos orgánicos, todos productos del metabolismo aerobio, microaerófilo y anaerobio facultativo de la flora microbiana asociada a la carne envasada.
En cuanto a los ensayos microbiológicos realizados, se obtuvo que las poblaciones microbianas en las carnes envasadas, aun cuando éstas se conservaron a una temperatura muy baja de refrigeración ((2,0 ± 0,5) ºC), en el envase I tendieron a experimentar un marcado incremento hacia el día 60 de almacenamiento, éste se desaceleró hacia el día 90 de control, y a partir de ese momento las curvas poblacionales evidencian que los microorganismos entraron en un proceso de autolimitación. Para el envase II, se observó al día 30 de control, un marcado incremento de población y los 60 días se evidencio el proceso de autolimitación. En ambos envases el orden de unidades formadoras de colonias (U.F.C) fue el mismo.
La identificación estructural de las diferentes capas de los envases y sus propiedades mecánicas más importantes se muestra en la Tabla 1 y 2.

Tabla 1: identificación estructural de los envases.

Envase	Espesor nominal (µm)	Espesor promedio (µm)	Componentes estructurales (Capas)
I	55	56,1	Polietileno de alta densidad (HDPE)/Poli cloruro de vinilo (PVC)/Polietileno de alta densidad
II	50	55,3	Polietileno de alta densidad/Poli etilen tereftalato (PET)

Del análisis de las propiedades mecánicas resumidas en la Tabla 2, se puede observar que la película correspondiente a la muestra I es más flexible y mientras que la muestra II es más resistente y rígida. Estos comportamientos se le atribuyen a que el primero presenta la mayor deformación al quiebre (D) y el segundo

posee la mayor resistencia a la tracción (>Ts). Por otra parte, se pudo comprobar por espectroscopía FT-IR, que las películas no sufrieron cambios significativos en la estructura química a lo largo del periodo de almacenamiento.

Tabla 2: propiedades mecánicas de los films sin envasar.

Propiedades mecánicas de los films sin envasar					
Muestra	**Extensión al corte (mm)**	**Deformación al quiebre (x 10^{-2})**	**Carga al corte (N)**	**Resistencia a la tracción (Ts)[x 10^{+6} N/m^2]**	**Tiempo de corte (s)**
I	101 ± 4	95 ± 3	28 ± 1	55 ± 3	195 ± 8
II	84 ± 1	76 ± 1	37 ± 2	75 ± 3	159 ± 4

El comportamiento obtenido para cada una de las muestras con respecto a la masa de agua absorbida en el ensayo de permeabilidad al vapor de agua en función del tiempo, se muestra en la Figura 1. Como se puede observar la velocidad de absorción al vapor de agua de la muestra I es notablemente inferior a la de muestra II.

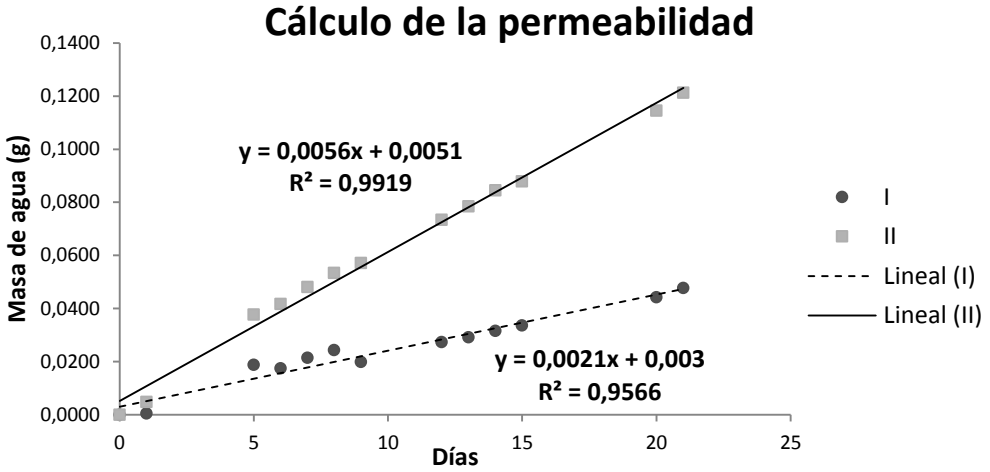


Figura 1: masa de agua absorbida por las películas utilizadas en el envasado de la carne en función del tiempo.

Del gráfico anterior (**Figura 1**), se utilizaron luego las pendientes de cada regresión lineal correspondiente a cada uno de los envases, con el fin de calcular, en primer lugar la transmisión de vapor de agua (WVT) y la permeabilidad del film al vapor de agua (WVP) que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: valores de permeabilidad de vapor de agua de cada film.

Envase	**WVT ($g/día\,m^2$)**	**Espesor del film ($x\ 10^{-6}\ m$)**	**WVP (x $10^{-15} g/Pa\ m\ s$)**
I	1,09	54 ± 2	**3,00**
II	2,88	61 ± 3	**9,03**

Como se observa en la Tabla 3, la muestra II es tres veces más permeable al vapor de agua que la I.
En la Tabla 4 se resumen las permeabilidades al oxigeno de cada película a los distintos días de envasado:

Tabla 4: valores de permeabilidad al oxigeno para los distintos films en los diferentes días de almacenamiento.

Permeabilidad al oxigeno ($^{cm^3}/_{(día\ m^2\ atm)}$)					
Muestra	**Sin envasar**	**Día 30**	**Día 60**	**Día 90**	**Día 120**
I	22,9 ± 0,5	12,9 ± 0,6	15 ± 3	15,8 ± 0,5	18,1 ± 0,3
II	7,1 ± 0,8	4,1 ± 0,9	3,1 ± 0,3	7 ± 1	-

Claramente, se observa que en ambos casos, las muestras varían poco la permeabilidad al oxigeno con el tiempo, pero que la muestra I es más permeable que la II.
Por antecedentes bibliográficos (Gonzáles M.L, Riande E. 2006) se conoce que el PET posee menor permeabilidad al oxigeno que el PVC y mayor permeabilidad al vapor de agua que el PE. Es por esta razón, que la muestra I que tiene PVC como uno de los componentes de sus capas posee mayor permeabilidad al oxigeno, a diferencia de la muestra II que tiene PET. Por otro lado, en cuanto a la permeabilidad al vapor de agua, la muestra I es menos permeable, ya que poseen polietileno de alta densidad (HDPE) en ambas capas superficiales; mientras que la muestra II tiene PET.
El conjunto de resultados obtenidos con relación a los indicadores microbiológicos, los parámetros fisicoquímicos considerados y los estudios llevados a cabo con los materiales de envasado, parecen indicar que el factor crítico son las propiedades barreras de los materiales usados para el envase multicapa.

CONCLUSIONES

Los distintos ensayos microbiológicos y físico-químicos en bloques de carne, que junto a los estudios de los films usados para el envasado permitieron obtener conclusiones importantes acerca de la interacción entre los materiales de envasado y las muestras de carne. Entre ellas vale destacar que el envase correspondiente a la muestra I fue la que demostró mejores resultados para el envasado de carnes al vacío, ya que reúne las propiedades físico-químicas (flexibilidad, resistencia, multicapa de materiales barrera de uso reconocido) óptimas para tal fin. Sin lugar a dudas, una cierta permeabilidad al oxigeno es necesaria para regular la reacción redox que da origen a la metaglobina que da origen al color pardo en carnes.

BIBLIOGRAFIA

AOAC Official Method 920.174 y 920.43. 2005. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist International, 18ª ed. MA, USA: AOAC International.
AOAC Official Method 950.46. 2008. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist International, 18ª ed. MA, USA: AOAC International.
Bacteriological Analytical Manual, FDA-BAM. 1995. 8ª ed. AOAC International.
Costamagna V., Strumia M., López-González M, Riande E. 2006. Gas transport in surface-modified low-density polyethylene films with acrylic acid as a grafting agent. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 44: 2828–2840.
Downes F. P., Ito K. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4ª ed. APHA.
Forsythe S.J., Hayes P.R. 2007. Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP. 3ª ed. S.A. Zaragoza: Acribia. Pag. 489.
González A., Strumia M.C., Alvarez Igarzabal C.I. 2011. Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation. Journal of Food Engineering, 106: 331-338.
Ripoll G., Albertí P., Casasús I., Blanco M. 2013. Instrumental meat quality of veal calves reared under three management systems and color evolution of meat stored in three packaging systems. Meat Science, 93: 336–343.
Madhavi, D. L., & Carpenter, C. E. 1993. Aging and processing affect color, metmyoglobin reductase and oxygen-comsuption of beef muscles. Journal of Food Science, 58: 939–942.
Albertí, P., Ripoll, G., Casasús, I., Blanco, M., Chapullé, J. L. G., & Santamaría, J. 2005. Efecto de la inclusión de antioxidantes en dietas de acabado sobre la calidad de carne de terneros. ITEA-Informacion Tecnica Economica Agraria, 101: 91–100.

Sanz, A., Ripoll, G., Blasco, I., Alvarez-Rodríguez, J., & Albertí, P. 2011. Performance of yearling, bull and steer of Serrana de Teruel breed. In A. Sanz, I. Casasús, M. Joy, J. Álvarez-Rodriguez, J. H. Calvo, B. Panea, P. Muñoz, & J. Balcells (Eds.), XIV Jornadas sobre Producción Animal, Vol. II. (pp. 745–747) Zaragoza, Spain: AIDA.

Ripoll, G., Albertí, P., Panea, B., & Joy, M. 2007. Efecto de la inclusión de lino y vitamina E en la dieta sobre la evolución del color de la carne de terneros de raza Pirenaica. ITEA-Informacion Tecnica Economica Agraria, Extra 28(II), 765–767.

Jeremiah, L. E. 2001. Packaging alternatives to deliver fresh meats using short- or long-term distribution. Food Research International, 34: 749–772.

Hiltner A., Liu R., Hu Y., Baer E. 2005. Oxygen Transport as a Solid-State Structure Probe for Polymeric Materials: A Review. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 43: 1047-1063.

López-González M., Riande E. 2006. Criterios para conseguir materiales barrera a medida. Revista de Plasticos Modernos, 91: 241-248.

Mancini R.A., Hunt M.C. 2005. Current research in meat color. Meat Science, 71: 100-121.

Scheichl R., Klopffer M.H., Benjelloun-Dabaghi Z., Flaconnèche B. 2005. Permeation of gases in polymers: parameter identification and nonlinear regression analysis. Journal of Membrane Science, 254: 275-293.

Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. Standard, ASTM. West Conshohocken: ASTM International, 2002, (D882-02).

Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. Standard, ASTM. West Conshohocken: ASTM international, 2010, (E96M-10).

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo agradecen a los responsables del programa Córdoba Innovadora de la ADEC (Agencia para el Desarrollo Económico de Córdoba), por el apoyo brindado para la concreción de este proyecto. Este proyecto formó parte del practicanato profesional del Lic. Agazzi.

Películas de proteínas de triticale con actividad antimicrobiana

Aguirre, A.[1,2]; Borneo, R.[1,2]; Colombo, A.[1,2], Passalaqua, N.[3]; León A.E.[1,4]

1. ICYTAC, Universidad Nacional de Córdoba – CONICET
2. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.
3. CEPROCOR, Córdoba.
4. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.
aaguirre@efn.uncor.edu

Resumen: Se prepararon películas en base a proteínas de triticale con actividad antimicrobiana por el agregado de aceite esencial de orégano (AEO) y se evaluó su efecto sobre las propiedades mecánicas, antimicrobianas y de barrera. El agregado de AEO no afectó la permeabilidad al vapor de agua de las películas, pero aumentó su solubilidad en agua y el porcentaje de elongación (%E), mientras que redujo la fuerza máxima de ruptura (TS) y el módulo elástico de Young. Las películas con AEO mostraron mayor actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* que contra *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa.* El efecto antimicrobiano del AEO fue incorporado y expresado en las películas de triticale, lo cual ofrece una potencial alternativa para su uso en el embalado y conservación de alimentos.

Palabras clave: triticale, películas antimicrobianas, propiedades mecánicas, aceite esencial de orégano, permeabilidad

Abstract: Antimicrobial triticale protein films were prepared by incorporating oregano esential oil (OEO). The effect of different concentrations of OEO on antimicrobial activity and on mechanical and barrier properties of films plasticized with glycerol were evaluated and compared with films without antimicrobial agent. The addition of OEO did not affect the water vapor permeability of films, increased water solubility and the percent elongation of the films, and reduced tensile strength and Young's modulus. Films with OEO showed higher antimicrobial activity against the Gram positive bacterium *S. aureus*, and lower for Gram negative (*E. coli* and *P. aeruginosa*). The obtained results proved the permanence of OEO in the polymer matrix after processing, making them able to be used as active additives in film formulation.

Keywords. Triticale, antimicrobial film, mechanical properties, oregano essential oil, permeability

INTRODUCCION

En los últimos años se ha visto un interés creciente en desarrollar materiales con capacidad de formar películas y con propiedades antimicrobianas, lo que ayudaría a mejorar la seguridad alimentaria y la vida media de los alimentos (Dutta *et al*., 2009). En la preservación de los alimentos, una de las maneras de introducir agentes activos es la incorporación de antimicrobianos en las películas de recubrimiento. La aplicación directa de la sustancia activa por rociado, fumigación o inmersión no es efectiva, ya que dichas sustancias pueden reaccionar con los componentes del alimento (incluso modificando las propiedades del mismo), pueden evaporarse o difundir en los alimentos reduciendo su actividad antimicrobial, lo que resulta en la necesidad de aplicar grandes concentraciones de antimicrobiano (Han y Floros, 1998, Kristo *et al*., 2008).

En cambio, la incorporación de un biocida en el material de recubrimiento tiene varias ventajas, tales como mantener la concentración del agente activo directamente en la superficie del alimento, disminuir las posibilidades de que la sustancia activa se inactive por algún componente del alimento, todo ello sin incorporar directamente el antimicrobiano como un aditivo (Comma, 2008).

Los antimicrobianos adecuados para incorporarlos en películas biodegradables en contacto con alimentos pueden ser agrupados en varias categorías que incluyen: ácidos orgánicos (acético, benzoico, láctico, propiónico y sórbico), ésteres de ácidos grasos (gliceril monolaurato), polipéptidos (lisozima, peroxidasa, lactoferrina y nisina), aceites esenciales de plantas (canela, orégano, etc), nitritos y sulfitos (Rojas-Grau *et al*., 2009).

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos aromáticos obtenidos de plantas (de flores, brotes, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, maderas, frutas o raíces) y se pueden obtener por diferentes métodos. Se

piensa que el término "aceite esencial" deriva del nombre acuñado en el siglo XVI por el médico suizo Paracelsus von Hohenheim, que llamó así al componente efectivo de una droga *Quinta essentia* (Burt, 2004). De los aproximadamente 3000 aceites esenciales que se conocen, son cerca de 300 los comercialmente importantes y se destinan principalmente al mercado de las fragancias y aromatizantes. También se les reconoce a los aceites esenciales propiedades antimicrobianas (Mourey y Canillac, 2002), antivirales (Bishop, 1995), antimicóticas (Mari *et al*, 2003; Lucini, 2004; Lucini *et al*., 2006), antiparasitarias (Pandey *et al*., 2000) e insecticidas (Konstantopoulou *et al*., 1992). Los aceites esenciales comprenden un gran número de componentes y es probable que su modo de acción involucre varios objetivos en la pared celular. La hidrofobicidad de los aceites esenciales los hace capaces de intercalarse entre los lípidos de la membrana celular y de la mitocondria volviéndolas permeables y provocando así la pérdida de material celular (Burt, 2004).

Estudios de la actividad antimicrobiana de varios aceites esenciales han demostrado que el orégano (*Origanum vulgare*) es uno de los agentes antibacterianos más efectivos (Friedman *et al.*, 2002). El aceite esencial de orégano (AEO) tiene actividad antimicrobiana contra varias especies de bacterias, tales como *Salmonella* (Helander *et al.*, 1998) y *Escherichia coli* O157:H7 (Burt y Reinders, 2003). Pelissari *et al*., (2009) han mostrado que películas de almidón y quitosano combinadas con AEO son efectivas contra *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*.

En la literatura podemos encontrar numerosos trabajos que nos presentan datos sobre la composición de los aceites esenciales (Delaquis *et al*., 2002; Burt, 2004) que pueden incluir hasta más de 60 componentes individuales. Los componentes principales constituyen hasta un 85% del total mientras los demás están presentes como trazas (Tabla 1).

Tabla 1. Componentes principales del aceite esencial de orégano que exhiben propiedades antibacterianas

Nombre	**Componente principal**	**Composición aproximada (%)**	**Referencias**
Origanum vulgare	Carvacrol	Trazas-80%	Prudent *et al*. (1995)
	Timol	Trazas-64%	Charai *et al*. (1996); Sivropoulou *et al*., (1996)
	γ-Terpineno	2 –52%	Kokkini *et al*., (1997)
	p-Cimeno	Trazas-52%	Marino *et al*. (2001)

Los componentes fenólicos tales como carvacrol, eugenol (2-metoxi-4-(2-propenil) fenol), y timol son los responsables principales de las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales (Cosentino *et al*., 1999; Burt, 2004). El modo de acción es generalmente considerado la ruptura de la membrana plasmática, interrumpiendo el flujo de electrones, el transporte activo, y/o la coagulación del contenido celular (Buró, 2004). También hay evidencias de que otros componentes que están en menor proporción tienen un papel muy importante en la actividad antibacteriana, posiblemente produciendo un efecto sinérgico con otros (Marino *et al.*, 2001).

Los objetivos del presente trabajo fueron: incorporar aceite esencial de orégano a películas elaboradas con proteínas de triticale, estudiar el efecto del agregado de aceite esencial de orégano sobre las propiedades físicas, mecánicas, de barrera al vapor de agua de dichas películas y evaluar las propiedades antimicrobianas de las películas de triticale.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las proteínas se extrajeron de harina de triticale según Aguirre *et al*., (2011). Las albúminas y globulinas se extrajeron a partir de harina de triticale con una solución de NaCl al 5% con agitación durante una hora. Se centrifugó a 10000xg durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Al precipitado se lo dispersó en una solución de etanol al 70% (v/v), con agitación durante una hora. Se centrifugó a 10000xg durante 15 minutos y se descartó el precipitado. El sobrenadante constituye la fracción SI de proteínas de triticale. La obtención de aceites esenciales (AE) a partir de hojas de orégano se realizó con la técnica de hidrodestilación utilizando un aparato tipo Clevenger. Se usaron 200 g de hojas secas y la duración de hidrodestilación fue de 1 hora. El estudio de los aceites esenciales se realizó por cromatografía gaseosa (GC) y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS). Las películas se realizaron según la técnica de evaporación del

disolvente ("casting"). La solución formadora del film se preparó con 7,5% de proteínas de la fracción SI (gramos por 100 mL de solución), 20% de glicerol (gramos por 100 gramos de proteína) y etanol al 70% (v/v). A las soluciones formadoras de film se les agregaron distintas concentraciones de aceite esencial de orégano (AEO): 0, 1 y 2 % (p/v). Se agitó 15 min y se colocaron 20 mL de las suspensiones en moldes siliconados (12 cm de diámetro) que se secaron a 40 ºC en horno con circulación de aire. Las concentraciones utilizadas en este estudio fueron un compromiso para obtener efectiva actividad antimicrobiana sin afectar adversamente la aceptabilidad organoléptica de las películas. Las películas se acondicionaron previamente a las mediciones durante 72 h en cámara adecuada a 32,78% de humedad relativa (RH) con solución saturada de $MgCl_2$ a 25 ºC. El espesor de las películas se midió con un micrómetro (en 5 posiciones al azar) y el valor medio se utilizó para las mediciones de permeabilidad y propiedades mecánicas. El contenido de agua, la solubilidad y la permeabilidad al vapor de agua de los films se determinaron según Aguirre *et al.* (2011). Las propiedades mecánicas (fuerza máxima de ruptura, porcentaje de elongación en la ruptura, módulo elástico de Young y fuerza máxima de punción al punto de ruptura) se evaluaron con un texturómetro TA.XT2i-Stable Micro System (Surrey, Gran Bretaña). Se determinó la actividad antimicrobiana de las películas con AEO por el método de difusión en disco, mediante la medición de los halos de inhibición por análisis digital de imágenes con el programa Image J (http://rsbweb.nih.gov/ij/). Se evaluaron las siguientes cepas patógenas *Staphylococcus aureus* (ATCC 29737), *Escherichia coli* (ATCC 25923) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Los datos obtenidos se trataron estadísticamente mediante un análisis de varianza (Microsoft Excel 2000) y los resultados fueron comparados por el Student's *t*-test a un nivel de significación de $p<0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de aceite esencial en nuestra muestra de orégano fue de 3,90 ± 0,25 mg/g hoja seca de orégano. Los componentes principales encontrados fueron los monoterpenos hidrato de trans-sabineno (34,30%), timol (17,93%) y carvacrol (3,8%). La estructura química de los componentes del aceite esencial afecta su modo de acción y su actividad antibacteriana (Dorman y Deans, 2000). En general, los aceites esenciales que poseen más actividad antibacteriana contienen un alto porcentaje de carvacrol y/o timol (Gutierrez *et al*., 2008). La importancia de la presencia de grupos oxhidrilo en dichos compuestos fenólicos ha sido confirmada por Dorman y Deans (2000). También es importante la presencia de estos dos compuestos fenólicos juntos, ya que el trabajo de Lambert *et al*., (2001) mostró que la combinación de carvacrol y timol eran aditivas contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*. El compuesto β cariofileno, también presente en el aceite esencial utilizado, tiene actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram-positivas, según el trabajo publicado por Longaray Delamar *et al*. (2005).

El agregado de aceite esencial de orégano no produjo diferencias significativas en los valores de espesor de las películas. La Tabla 2 muestra que la incorporación de AEO no afectó significativamente el contenido de humedad de los films de triticale excepto para aquellos con 2% de concentración de AEO, en los cuales se observó un incremento del 28%. La adición de AEO en las concentraciones de 0,5, 1 y 1,5% (p/p) tampoco afectó significativamente el contenido de agua de films de proteínas de suero de leche (Zinoviadou *et al*., 2009)

Tabla 2. Efecto de la concentración de aceite esencial de orégano sobre el contenido de humedad, solubilidad en agua y permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas de proteínas de triticale

Aceite esencial de orégano (%)	**Contenido de humedad (%)**	**Solubilidad (%)**	**WVP x 10^{10} (g m^{-1} s^{-1} Pa^{-1})**
0	11,83 ±1,03[a]	41,22±0,09 [a]	0,33±0,04 [a]
1	11,43±1,02 [a]	45,91±0,36 [b]	0,35±0,05 [a]
2	15,15±0,82 [b]	46,48±0,49 [b]	0,40±0,05 [a]

Cada valor es el promedio ±desviación estándar de los resultados obtenidos. Diferentes letras en la misma columna indica diferencias significativas ($p<0,05$)

La incorporación de AEO aumentó la solubilidad en agua de las películas de triticale (Tabla 2) con respecto al control (sin AEO) pero no hubo diferencias significativas entre las dos concentraciones de aceite esencial incorporado. Este aumento en la materia soluble podría ser debido a una menor densidad de interacción de la

red polimérica por la presencia de AEO, ya que la interacción entre glicerol y polifenoles afecta las propiedades de solubilidad de los films debido a las similitudes en su estructura (por ej. grupos OH).
Se midió la permeabilidad al vapor de agua de las películas de proteínas de triticale adicionadas con aceite esencial de orégano a una diferencia de presión de vapor de 0-60% HR a través del film. La Tabla 2 muestra que la incorporación de aceite esencial de orégano no afectó significativamente la permeabilidad al vapor de agua de las películas de proteínas de triticale. La hidrofobicidad de la compleja mezcla que es el AEO a las concentraciones usadas en este estudio no fue suficiente para neutralizar el carácter hidrofílico de las proteínas de triticale y del glicerol usado en la formulación del film, ya que la permeabilidad al vapor de agua depende de la relación hidrofílico/hidrofóbico de los constituyentes del film (Pelissari, 2009). Resultados similares a los presentes fueron encontrados para películas de proteínas de suero de leche, en las cuales la incorporación de AEO no afectó la permeabilidad al vapor de agua en ninguna de las concentraciones utilizadas (Zinoviadou *et al*., 2009).
Las propiedades mecánicas de las películas estudiadas se muestran en la Tabla 3. La fuerza máxima de ruptura (TS) fue afectada por la incorporación de AEO: a mayor concentración de aceite esencial, menor TS. La adición de AEO disminuyó significativamente el módulo elástico de Young (EM) y por lo tanto produjo films menos rígidos.

Tabla 3. Efecto de la concentración de aceite esencial de orégano sobre las propiedades mecánicas y ensayo de punción de las películas de proteínas de triticale

Aceite esencial de orégano (%)	**Fuerza máxima de ruptura (MPa)**	**Módulo elástico de Young (MPa)**	**Elongación a la ruptura (%)**	**Fuerza máxima de punción (N)**
0	2,90 ±0,03[a]	147,59±0,71 [a]	9,67±1,25[a]	1,17±0,17[a]
1	2,08±0,19 [a]	82,53±11,22 [b]	12,10±0,26 [b]	1,04±0,43 [a]
2	0,85±0,16[b]	21,75±10,58 [c]	84,56±5,18[c]	0,98±0,29[a]

Cada valor es el promedio ±desviación estándar de los resultados obtenidos. Diferentes letras en la misma columna indica diferencias significativas ($p<0,05$)

Similar tendencia fue encontrada en películas de almidón de mandioca y quitosano con AEO (Pelissari *et al*., 2009) y en películas de proteínas de suero de leche (Zinoviadou *et al*., 2009). La incorporación de AEO al 2% afectó significativamente la Elongación a la ruptura (%E) de las películas de triticale que aumentó desde 9,67% (sin AEO) a 84,56% (2% AEO). Zivanovic *et al*. (2005) observaron una disminución en TS y un incremento en %E en films de quitosano combinado con aceites esenciales, mientras que Pelissari *et al*., (2009) observaron la misma tendencia en películas de almidón de mandioca y quitosano con AEO. En películas de proteínas de suero de leche (Zinoviadou *et al*., 2009) la incorporación de AEO produjo un incremento en %E cuando su concentración fue hasta 1% (p/p) de la solución formadora de film. El agregado de AEO a las películas de proteínas de triticale produjo que la matriz de los films fuera menos densa, lo que facilitó el movimiento de las cadenas poliméricas de proteínas, mejoró la flexibilidad de los films y produjo películas menos rígidas, el comportamiento típico de pequeñas moléculas que causan plastificación en un biopolímero. La incorporación de AEO no afectó significativamente la fuerza máxima de punción (FP) de las películas de proteínas de triticale.
Las películas preparadas con AEO fueron evaluadas contra microorganismos para determinar la actividad antimicrobiana de las mismas (Figura 1 y Tabla 4). Las películas de proteínas de harina de triticale sin AEO no inhiben el crecimiento de los microorganismos estudiados. El efecto inhibitorio de los AEO fue incorporado y expresado en las películas de triticale, ya que las zonas de inhibición aumentaron significativamente con el incremento de la concentración de AEO.

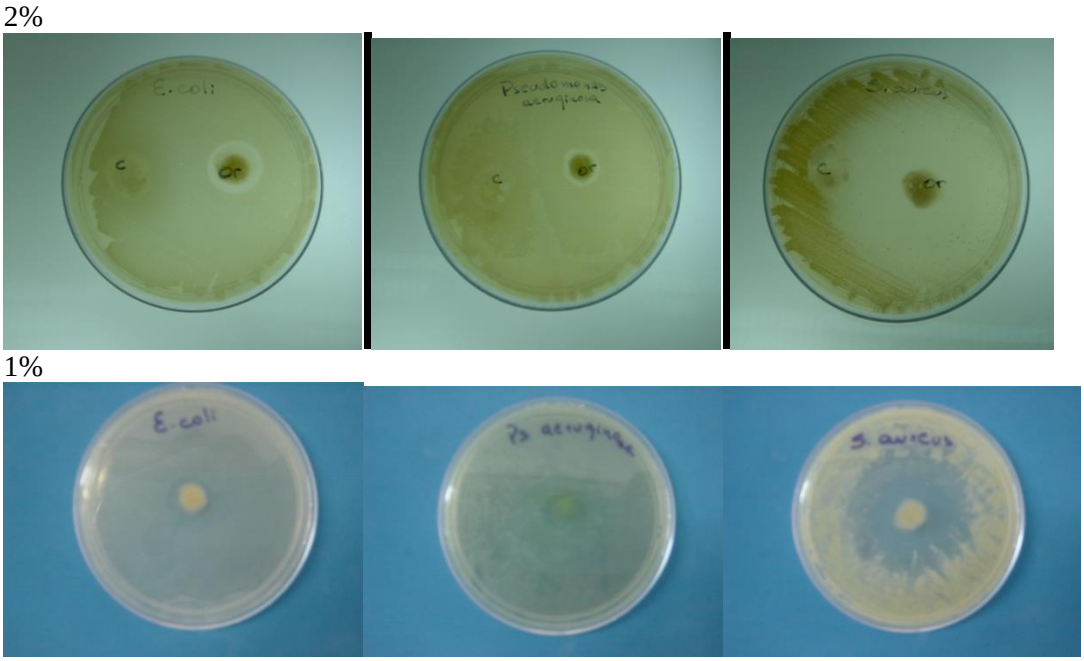


Figura 1. Zonas de inhibición de las películas de proteínas de triticale con aceite esencial de orégano contra *E. coli, S. aureus* y *P. aeruginosa*. C: control

Los mayores halos de inhibición se observaron para la bacteria Gram positiva *S. aureus*, mientras los menores para las Gram negativo (*E. coli* y *P. aeruginosa*). La concentración de 1% AEO no fue efectiva contra *P. aeruginosa*. Numerosos estudios coinciden en que los aceites esenciales son más efectivos contra las bacterias Gram-positivas que contra las Gram-negativas (Burt, 2004; Pelissari *et al*., 2009). Este resultado podría deberse a la presencia de una membrana externa adicional alrededor de la pared celular en las bacterias Gram-negativas, la que restringe la difusión de compuestos hidrofóbicos a través de su cubierta lipopolisacárida (Burt, 2004).

El mecanismo propuesto por Zivanovic *et al*., (2005) para la actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos de los aceites esenciales es su ataque a los fosfolípidos de la membrana celular, lo que causa un incremento en la permeabilidad y pérdida de citoplasma, o su interacción con enzimas localizadas en la pared celular. Así, la resistencia de las bacterias Gram-negativas a los aceites esenciales residiría en el rol de protección de los lipopolisacáridos de su pared celular o en las proteínas extrínsecas de membrana.

Dadalioglu y Evrendilek (2004) atribuyen la actividad antimicrobiana del AEO a dos componentes: el carvacrol (compuesto fenólico) y *p*-cimeno (monoterpeno). Buró (2004) describe la acción del carvacrol como de desintegración de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas seguido de la liberación de los lipopolisacáridos presentes, lo que resulta en un incremento en la permeabilidad de la membrana citoplasmática al ATP. Aunque el aceite esencial usado en este estudio no tenía como uno de sus componentes de mayor concentración al carvacrol, la presencia de los componentes que están en menor concentración tienen gran importancia también, ya que pueden tener un efecto sinérgico que potencie su influencia en la actividad del aceite esencial (Burt, 2004; Gutierrez *et al.*, 2008). La concentración de *p*-cimeno en nuestra muestra fue de 0,93%, pero se ha descripto sinergismo entre ellos. El componente *p*-cimeno en sí es un débil antibacteriano, pero produce hinchamiento de la membrana celular de las bacterias y así probablemente permita que el carvacrol ingrese más fácilmente a la célula bacteriana (Ultee *et al*., 2000).

Tabla 4. Actividad antimicrobial de películas de proteínas de triticale enriquecidas con aceite esencial de orégano.

Zona de inhibición (mm)			
	Concentración de aceite esencial de orégano		
Microorganismo	**0%**	**1%**	**2%**
E. coli	0	10,81±1,59	21,53±2,05
S. aureus	0	166,90±4,07	342,36±10,63
P. aeruginosa	0	0	9,70±1,07

Diferentes letras en la misma columna indica diferencias significativas ($p<0,05$)

Entre las bacterias Gram-negativas, *P. aeruginosa*, presenta la característica particular de ser la menos sensible a la acción de los aceites esenciales (Cosentino *et al*., 1999; Dorman y Deans, 2000; Wilkinson *et al*., 2003, Gutiérrez *et al*., 2008). Dicha resistencia intrínseca es debida a la barrera de la membrana exterior de la bacteria (Mann *et al*., 2000). Los presentes resultados mostraron que dicha tendencia se da también cuando el aceite esencial es vehiculizado en una película biodegradable como en este estudio.

La incorporación de AEO al 1% a películas de proteínas de suero de leche fue efectiva contra *E. coli* O157:H7 y *Pseudomonas* spp (Oussallah *et al*., 2004). La actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano también fue expresada en películas de proteínas de suero de leche (Seydim y Sarikus, 2006). En estas películas la mínima cantidad de AEO efectiva contra los organismos estudiados (*L. plantarum, S. enteritidis, E. coli, L. monocytogenes y S.aureus*) fue del 2% (p/v de solución formadora de film) (Seydim y Sarikus, 2006). En películas de soja, un aumento en la concentración de AEO resultó en mayor actividad antimicrobiana (medida como diámetro de inhibición) contra *S. aureus* hasta una concentración de 3% (Emiroglu *et al*., 2010). Estas películas también mostraron actividad antimicrobiana contra *E.coli* y *P. aeruginosa*. Se puede concluir que la fuente, la composición y la concentración de compuestos activos del extracto usado tuvieron un efecto crucial sobre la actividad biológica de las películas.

En algunos casos la actividad del aceite esencial disminuye considerablemente cuando se lo incorpora a un sistema complejo (Gutiérrez *et al*., 2008). Es por ello que un aspecto importante de la aplicación de aceites esenciales de plantas es la evaluación de su eficacia en el sistema a utilizar. El trabajo de Baranauskiene *et al*. (2006) muestra que las proteínas usualmente poseen una alta capacidad de unirse a compuestos volátiles aromáticos. Otros estudios han mostrado que las proteínas de leche son factores limitantes en el poder biocida (Devlieghere *et al*., 2004), aunque en la literatura es posible encontrar películas elaboradas con proteínas que poseen actividad antimicrobiana (Zivanovic *et al*., 2005; Oussallah *et al*., 2004; Kristo *et al*., 2008). El presente trabajo mostró que la actividad antimicrobiana de los AEO pudo ser expresada en las películas de proteínas de triticale.

La aplicación de AE a películas está limitada por los cambios organolépticos que pueden ocurrir y la calidad de los films obtenidos. Como la actividad antimicrobiana depende no sólo de la composición química, sino también de las propiedades lipofílicas, la potencialidad de los grupos funcionales o la solubilidad en agua (Dorman y Deans, 2000), la mezcla de componentes con diferentes propiedades bioquímicas pueden modificar la eficacia de los aceites esenciales. Pero los resultados obtenidos en este estudio mostraron que las películas de proteínas de triticale pueden ser portadoras eficaces de las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de orégano.

BIBLIOGRAFÍA

Aguirre, A., Borneo, R., León, A.E. (2011). Properties of triticale flour protein based films. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1853-1858.

ASTM E-96-80. 1990. Standar test method for water vapour transmisión in materials. In *Annual book of ASTM standards*, Philadelphia, Pennsylvania: American Society for Testing and Materials.

Baranauskiene, R., Venskutonis, P.R., Dewettinck, K., Verhe, R. 2006. Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices. Food Research International 39: 413-425.

Bishop, C.D. 1995. Antiviral activity of the essential oil of Melaleuca alternifolia (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. Journal of Essential Oil Research 7: 641– 644.

Buró, S.A., Reinders, R.D. 2003. Antibacterial activity of selected plant eseential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters** in **Applied Microbiology** 11: 33-37.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods. A review. International Journal of Food Microbiology 94: 223-253.

Charai, M., Mosaddak, M., Faid, M. 1996. Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. Journal of Essential Oil Research 8: 657–664.

Comma, V. 2008. Bioactive packaging technology for extended shelf life of meta-based products. Meat Science 78: 90-103.

Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F. 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. Letters in Applied Microbiology 29: 130– 135.

Dadalioglu, I., Evrendilek, G. 2004. Chemical composition and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutuflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas L.*) and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodbone pathogens. Journal of Agriculture and Food Chemistry 52: 8255-8260.

Devlieghere, F., Vermeleulen, A., -Debevere, J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. Food microbiology 21: 703-714.

Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. International Journal of Food Microbiology 74: 101–109.

Dorman, H.J.D., Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology 88: 308– 316.

Dutta, P.K., Tripathi, S., Mehrotra, G.K., Dutta, J. 2009. Perspective for chitosan based antimicrobial films in food applications. Food Chemistry 114: 1173-1182.

Emiroglu, Z.K., Yemis, G.P., Coskun, B.K., Candogan, K. 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. Meat Science 86: 283-288.

Friedman, M., Henika, P.R., Mandrel, R.E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. Journal of Food Protection 65:1545-1560.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P. 2008. The antimicrobial eficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. International Journal of Food Microbiology: 124, 91-97.

Han, J.H., Floros, J.D. 1998. Potassium sorbate difusivity in American processed and Mozzarella chesses. Journal of Food Science 63: 435-437.

Helander, I.M., Alokomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Wright, A.V. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal of Agriculture and Food Chemistry 46: 3590-3595.

Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N., Lanaras, T. 1997. Autumn essential oils of Greek oregano. Phytochemistry 44: 883–886.

Konstantopoulou, I., Vassilopoulou, L., Mavragani-Tsipidou, P., Scouras, Z.G. 1992. Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven Greek aromatic plants on Drosophila auraria. Experientia 48: 616– 619.

Kristo, E., Konstantino, P.K., Biliaderis, C. 2008. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. Food Hydrocolloids 22: 373-386.

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G-J.E. 2001. A study of teh minimun inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology 91: 453-462.

Longaray Delamar, A.P., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Tai-Serafini, L., Echeverrigaray, S. 2005. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brasil. Food Chemistry 100: 603-608.

Lucini, E.I. 2004. Cambios en la composición lipídica del micelio de Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary y Sclerotium cepivorum Berk por acción de terpenos. Tesis Doctoral. Facultad Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 143 pp.

Mann, C.M., Cox, S.D., Markham, J.L. 2000. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCT6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Letters in Applied Microbiology 30: 294-297.

Mari, M., Bertolini, P., Pratella, G.C. 2003. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. Journal of Applied Microbiology 94: 761– 766.

Marino, M., Bersani, C., -Comi, G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiacea* and *Compositae*. International Journal of Food Microbiology 67: 187– 195.

Mourey, A., Canillac, N. 2002. Anti-Listeria monocytogenes activity of essential oils components of conifers. Food Control 13: 289– 292.

Oussallah, M., Caillet, S., Salmieri, S.; Saucier, L., ~~and~~ -Lacroix, M. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein based films containing essential oils for teh preservation of whole beef muscle. Journal of Agriculture and Food Chemistry 52: 5598-5605.

Pandey, R., Kalra, A., Tandon, S., Mehrotra, N., Singh, H.N., Kumar, S. 2000. Essential oil compounds as potent source of nematicidal compounds. Journal of Phytopathology 148: 501–502.

Pelissari, F., Grossman, M.V.E., Yamashita, F., Pineda, E.A. 2009. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. Journal of Agriculture and Food Chemistry 57: 7499-7504.

Prudent, D., Perineau, F., Bessiere, J.M., Michel, G.M., Baccou, J.C. 1995. Analysis of the essential oil of wild oregano from Martinique (Coleus aromaticus Benth.) evaluation of its bacterioatatic and fungistatic properties. Journal of Essential Oil Research 7: 165– 173.

Rojas-Grau, M.A., Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. 2009. The use of packaging techniques to mantain freshness in fresh-cut fruits and vegetables: a review. International Journal of Food Science and Technology 44: 875-889.

Seydim, A.C., Sarikus, G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, resemary and garlic essential oils. Food Research International 39: 639-644.

Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44: 1202–1205.

Ultee, A., Kets, E.P.W., Alberda, M., Hoekstra, F.A., Smid, E.J. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen Bacillus cereus to carvacrol. Archives of Microbiology 174: 233-238.

Wilkinson, J.M., Hipwell, M., Ryan, T., Cavanagh, H.M.A. 2003. Bioactivity of Backhousia citriodora: Antibacterial and antifungal activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 76– 81.

Zinoviadou, K., Koutsoumanis, K.P., Biliaderis, C. 2009. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing orégano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. Meat Science 82: 338-345.

Zivanovic, S. Chi, S., Draughon, A.F. 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. Journal of Food Science 70: 45-51.

Films biodegradables de PLA plastificados con tres plastificantes diferentes para su aplicación en el envasado de alimentos

Arrieta M.P.[1,2], Aleu G.[2], Zogbi A.P.[2], López J.[1]

1: Instituto de Tecnología de Materiales- Universidad Politécnica de Valencia, Alcoy, España.
2: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina. marrieta@itm.upv.es

Resumen: El poli(ácido láctico) (PLA) es uno de los polímeros biodegradables más prometedores para films para el envasado de alimentos debido a su biodegradabilidad, transparencia, origen renovable, bajo precio y disponibilidad en el mercado. Sin embargo, en la producción de films, el PLA presenta algunas desventajas, en sus propiedades mecánicas que hacen necesaria la adición de plastificantes. Así, el PLA plastificado con acetil-tri-n-butil citrato (ATBC) y poli(etilenglicol) (PEG) ha sido reportado. Recientemente se ha propuesto al limoneno como un monómero nuevo. El limoneno es el componente principal de los aceites de cítricos, siendo el residuo más importante en la industria de cítricos.
En este trabajo se ha plastificado PLA con ATBC, PEG y limoneno. La estructura superficial se evaluó por microscopía electrónica de barrido (SEM) observándose superficies homogéneas en todos los casos. La influencia del proceso de plastificación fue determinada mediante ensayos de tracción según la norma ASTM-D882. El efecto del plastificante en los films de PLA se caracterizó por un aumento en el alargamiento a la rotura, y una disminución en el módulo elástico y la resistencia a la tracción. Las propiedades ópticas se determinaron mediante el espacio colorimétrico CIELAB. No se observaron grandes diferencias entre PLA-plastificado y PLA puro.

Palabras clave: films biodegradables, PLA, plastificantes, envases alimentarios.

Abstract: Poly(lactic acid) (PLA) seems to be the most promising biodegradable polymer for film food packaging applications due to its biodegradation, superior transparency, being obtained from renewable resources, low price and its availability in the market. However, in film production, PLA presents some disadvantages, such as their poor mechanical properties which make necessary the addition of plasticizing compounds. In this sense, it has been reported PLA plasticized with acetyl tri-n-butyl citrate (ATBC) and poly(ethylene glycol). Alternatively, recent studies have been conducted on the use of limonene as new novel monomer. Limonene is the main component of citrus oils, being the most important residue in the citrus industry.
In this work PLA was plasticized with ATBC, PEG and limonene. The surface structure of films was evaluated by scanning electron microscopy (SEM). Homogeneous surfaces were observed in all cases. The influence of plasticization process was determinate by tensile testing according to ASTM-D882 Standard. The effect of plasticizer in PLA films was characterized by an increase in the elongation at break and a decrease in the elastic modulus and tensile strength. Optical properties were determined by using CIELab colour space. There were no big differences between plasticized-PLA and the pure PLA films colour properties.

Keywords: biodegradable films, PLA, plasticizer, food packaging.

INTRODUCCIÓN

La actitud de la sociedad cada vez más proactiva hacia una reducción en el impacto ambiental ha centrado la atención de numerosos investigadores con la finalidad de encontrar soluciones rentables y compatibles con la minimización y/o reutilización de residuos. En este sentido, no se puede ignorar el creciente problema referido a la gran cantidad de residuos plásticos derivados de los envases alimentarios que se acumulan y el impacto que éstos producen sobre el medio ambiente. La necesidad de ahorrar recursos y de minimizar residuos conduce a la demanda del desarrollo de nuevos materiales para la industria alimentaria. La revalorización de materiales plásticos a través del reciclado está ampliamente extendida. Sin embargo, presenta algunas limitaciones relacionadas con las dificultades para encontrar salidas precisas y económicamente viables (Averous 2004). Por otra parte, los sistemas de reciclaje exigen un cierto grado de pureza y una clasificación de alta precisión. Además, los costos de recogida son bastante altos, y el reciclado

tiene un impacto negativo en la calidad de los materiales, tales como un aumento de la fragilidad (Koller *et al*. 2010). En este sentido, los envases de materiales biodegradables han cobrado especial interés en la industria debido a que representan una alternativa para remplazar a los polímeros convencionales derivados del petróleo comúnmente utilizados (Arrieta *et al*. 2012). De entre todos los polímeros biodegradables estudiados, el poli(ácido láctico) (PLA) se ha posicionado en el mercado como el polímero biodegradable más prometedor para su aplicaciones de envasado de alimentos debido a una serie de propiedades ventajosas que presenta. El PLA es un biopoliéster obtenido de la polimerización del ácido láctico, donde los monómeros de partida son producidos por fermentación o síntesis química (Jamshidian *et al.* 2010). Es un polímero termoplástico, que puede obtenerse a partir de fuentes renovables, productos agrícolas simples, como el maíz (Auras *et al*. 2004; Martino *et al*. 2009). Además, el PLA es un material biodegradable (Fortunati *et al*. 2012), presenta una eleva transparencia (Auras *et al*. 2004), bajo costo (Badía *et al*. 2011) y se encuentra disponible en el mercado (Auras *et al*. 2004). Por otra parte, el PLA está reconocido como material seguro en aplicaciones de envasado de alimentos, clasificado como GRAS (de sus siglas en inglés Generally Recognized As Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) (FDA, 2005). Uno de los campos de aplicación más desarrollados para el PLA en la industria de envasado de alimentos es como film. Sin embargo, en la producción de films, se ha encontrado que el PLA presenta algunas desventajas, tales como sus pobres propiedades mecánicas que hacen necesaria la adición de plastificantes. Para poder adicionar un plastificante a la matriz de PLA, se debe tener en cuenta que la selección de los plastificantes está limitada por los requisitos de buena miscibilidad con la matriz polimérica y que no deben presentar toxicidad para la aplicación final. Se ha sugerido al poli(etilen glicol) (PEG) y citrato de acetil tri-n-butilo (ATBC) como buenos candidatos para la plastificación de polímeros destinados al envasado de productos alimenticios debido a que estos plastificantes se encuentran aprobados para el contacto con los alimentos por la legislación Europea (Corgneau *et al*. 2011). Por otra parte, estudios recientes han propuesto el uso de limoneno como un nuevo monómero. El limoneno es el componente principal de los aceites de cítricos siendo además el residuo más importante en la industria de los cítricos (Singh & Kamal, 2012), por lo que resulta interesante en términos medioambientales revalorizar este subproducto al usarlo como plastificante.
El principal objetivo de este trabajo es desarrollar films biodegradables de PLA-plastificado con tres diferentes plastificantes para el envasado alimentario. Se realizó las mezclas de los materiales a 170ºC y se obtuvieron en formato de films por moldeo por compresión. Posteriormente se realizó una caracterización mecánica y superficial para evaluar su posible aplicación en el envasado de alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Polímeros y plastificantes

El PLA en formato de pellet (PLA 4032D, Mn=217000 Da, 2 wt% D-isomero) fue suministrado por NatureWorks (USA). El ATBC (Mw= 402 g/mol, 98% de pureza) y PEG (Mn= 300) fueron suministrados por Sigma Aldrich (Móstoles, Madrid España). El limoneno (Mw= 136,24 g/mol, 97% de pureza) fue suministrado por Acros Organic (USA).

Preparación de las muestras de films

Los plastificantes, ATBC, PEG y limoneno, fueron añadidos en concentraciones de 15% en peso. Las mezclas de PLA y los distintos plastificantes se realizaron en una mezcladora Haake PolyLab QC (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) a 170 ºC a una velocidad de rotación constante de 50 rpm durante 8 min. Una vez obtenidas las mezclas homogéneas, los films se prepararon por moldeo por compresión en una prensa de platos calientes (Mini C 3850, Caver, Inc. USA) a 170 ºC y aplicando un ciclo de presión de (5 min sin aplicar presión, seguido de 1 min a 2 MPa, 1min a 3,5 MPa y finalmente mantenido 5 min a 3,5 MPa).

Caracterización de las nuevas formulaciones

El estudio de la morfología de la superficie de las muestras se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para ello, se utilizó un microscopio Phenom (FEI Company, Eindhoven The Netherlands) con una aceleración electrónica de 10kV. Las micrografías se obtuvieron a magnificaciones de 1000x. Las muestras fueron previamente metalizadas con un metalizador EMITECH SC7620 (EMITECH, UK) con una fina capa de oro, con la finalidad de poder hacerlas conductoras.
Las propiedades mecánicas a tracción se llevaron a cabo con una máquina de ensayos universales Single Column System Instron Instrument Modelo 3344 (Fareham Hants, UK) equipada con una célula de carga de

5 kN. Las probetas (10 x 100 mm) se colocaron a una distancia entre mordazas de 50 mm, sometidas a una velocidad de elongación de 25 mm min^{-1} y se estudiaron de acuerdo a la norma ASTM D882-91-01 (ASTM, 2001).
El estudio colorimétrico se realizó mediante el uso de un espectrofotómetro visible COLORFLEX-DIFF2 45º/0º HunterLab, (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, Virginia, USA) y se evaluaron los parámetros L*, a* y b* del espacio colorimétrico CIELab.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
En la **Figura 1** se muestran las micrografías 1000x de la superficie de PLA y PLA-plastificado con los tres plastificantes utilizados, obtenidas por microscopía electrónica de barrido. Todas las formulaciones mostraron una superficie homogénea sin separación de fases ni formación de aglomerados, lo que indica una correcta incorporación del plastificante a la matriz polimérica durante el procesado.

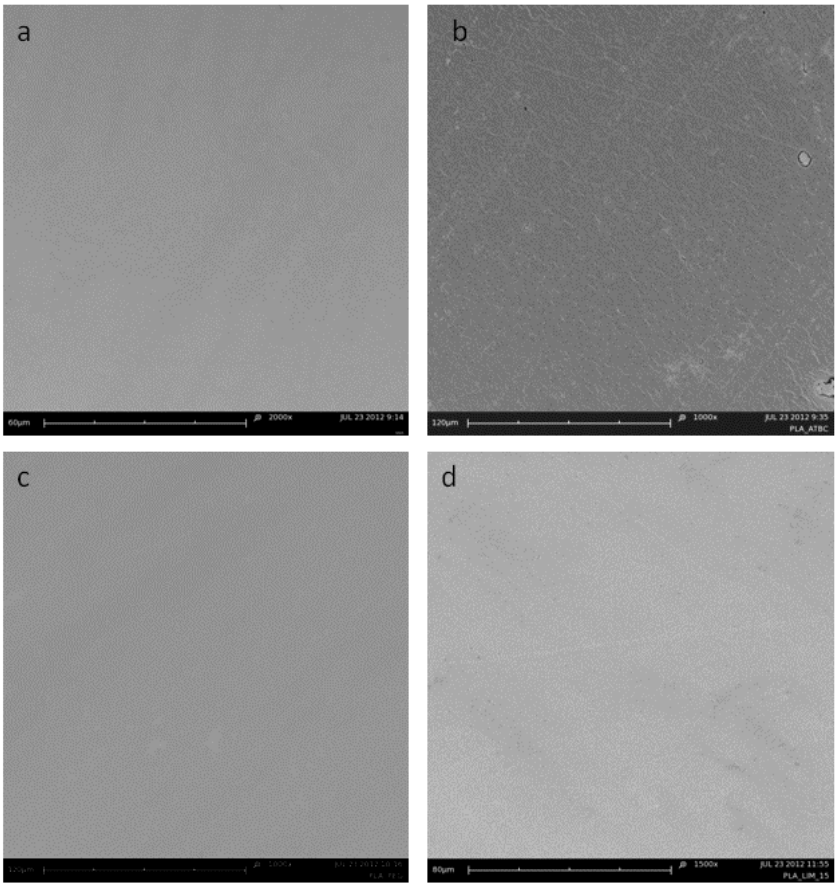


Figura 1. Micrografía SEM (1000x) de la superficie de los films: a) PLA, b) PLA-ATBC, c) PLA-PEG y d) PLA-limoneno.

Los resultados obtenidos a partir del ensayo de tracción tanto de módulo elástico de Young, *E*, como de resistencia a la tracción, *TS* (Figura 2), brindaron información sobre las propiedades de resistencia y de ductilidad de los nuevos materiales. La adición de plastificantes a la matriz polimérica tiene la finalidad de disminuir la fragilidad del PLA. De esta manera, todas las formulaciones plastificadas obtenidas presentaron menor fragilidad que el film de PLA puro, revelando valores menores tanto de *E* como de *TS* para los tres plastificantes. El ATBC y limoneno fueron los plastificantes que generaron una mayor reducción de *E* (775 ± 207 MPa y 839 ± 161 MPa, respectivamente), presentando un comportamiento muy similar entre ellos. Así mismo, estos dos plastificantes exhibieron valores similares de *TS* (23,4 ± 6,2 MPa y 24,6 ± 2 MPa, respectivamente), generando materiales con mayor ductilidad que el PLA puro. En el caso de PEG, la reducción de *E* con respecto al film de PLA puro es menor que para los otros dos plastificantes. Por lo tanto PEG, prácticamente no consigue disminuir la rigidez del PLA. Sin embargo, PLA-PEG es el film que presentó menor valor de TS demostrando que PEG es capaz de aumentar la ductilidad del PLA.

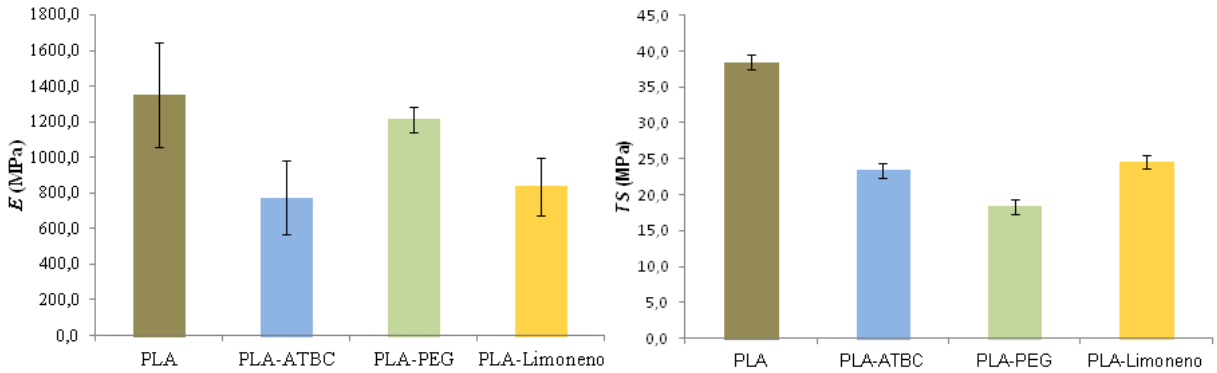


Figura 2. Resultados de E y TS de los films de PLA y PLA-Plastificado (n=5)

Como era de esperar, la adición de plastificantes generó materiales más extensibles que el film de PLA puro en todos los casos. En la **Figura 3** se muestran los resultados obtenidos mediante el ensayo de tracción de porcentaje de deformación a la rotura. Se puede observar que el aumento en la flexibilidad de los materiales plastificados es muy bajo en el caso de PEG, siendo el porcentaje de deformación a la rotura de 1,5% para el film de PLA puro y el film de PLA-PEG alcanza valores de tan sólo un 10%, mientras que PLA-ATBC y PLA-limoneno alcanzan valores de 240% y 200%, respectivamente. Este efecto destaca la eficiencia de ATBC y limoneno para plastificar al PLA.

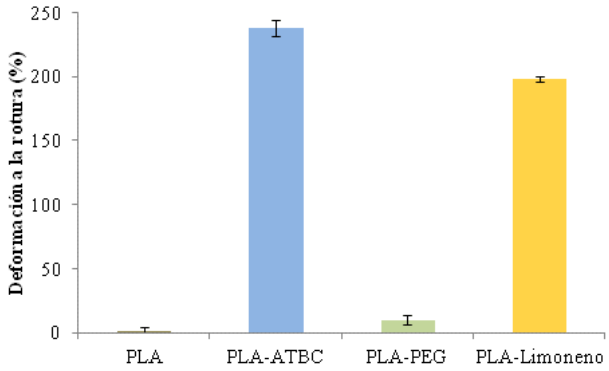


Figura 3. Resultados de deformación a la rotura de los films de PLA y PLA-Plastificado (n=5).

En un film destinado al envasado de alimentos la transparencia y el color resultan propiedades claves, dado que los consumidores prefieren aquellos envases que les permitan observar el alimento que contiene. Por lo tanto para obtener una medida cuantitativa de las propiedades ópticas de los nuevos materiales se llevó a cabo un análisis de medición de color mediante espectrofotometría visible utilizando el espacio colorimétrico CIELab. Los parámetros obtenidos fueron la luminosidad (coordenada L^*) y cromaticidad (a^* y b^*). Para poder comparar los films plastificados con el film de PLA puro, se utilizó el parámetro diferencia de color, ΔE^*, para lo cual se tomo el film de PLA puro como muestra de referencia. La diferencia de color existente entre una muestra de referencia y una muestra de ensayo, viene dado por la **Ecuación 1**.

Donde:

$$\Delta E^*_{CIE} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

$$\Delta L^* = L^*_{ensayo} - L^*_{referencia} \quad (2)$$

$$\Delta a^* = a^*_{ensayo} - a^*_{referencia} \quad (3)$$

$$\Delta b^* = b^*_{ensayo} - b^*_{referencia} \quad (4)$$

En la **Tabla 1** se expresan los valores de las coordenadas L^*, a^* y b^* como un promedio de 5 medidas tomadas en distintas partes de cada uno de los film seleccionadas al azar y el valor calculado de ΔE^*, para todas las formulaciones ensayadas.

Tabla 1. Resultados de las coordenadas CIELab y Δ*E** obtenidos para PLA y PLA-Plastificado (n=5)

Films ensayados	***L****	***a****	***b****	**Δ*E****
PLA[a]	94,08 ± 0,07	-1,03 ± 0,01	1,33 ± 0,05	-
PLA-ATBC	93, 46 ± 0,06	-0,77 ± 0,14	1,36 ± 0,06	0,67 ± 0,01
PLA-PEG	91,03 ± 0,15	-0,81 ± 0,17	1,58 ± 0,04	3,07 ± 0,08
PLA-limoneno	93,86 ± 0,09	-0,99 ± 0,01	1,27 ± 0,06	0,24 ± 0,04

[a] Coordenadas cromáticas de referencia.

Debido a su elevada transparencia, el film de PLA puro presentó mayor valor de L*. La adición de plastificante disminuye ligeramente los valores de la coordenada L*. Sin embargo esta disminución es tan pequeña que no altera la elevada transparencia de las muestras. La coordenada *a** mide la saturación, definiendo el eje rojo/verde como la desviación del punto acromático correspondiente a la luminosidad *L**, hacia el rojo si *a** > 0 o hacia el verde si *a** < 0. Los valores de *a** resultaron negativos en todos los casos indicando una ligera desviación de la coordenada *L** hacia el color verde. Por su parte, la coordenada *b** define el eje amarillo/azul. Si *b** > 0 desvía *L** hacia el amarillo y si *b** < 0 desvía *L** hacia el azul (Arrieta *et al*. 2011). Los valores de *b** obtenidos indican una ligera desviación de L* hacia el amarillo. Sin embargo, cabe destacar que los valores de *a** y *b** resultaron muy próximos a cero en todos los films ensayados, indicando que las muestras de PLA y PLA-plastificadas carecen prácticamente de coloración perceptible para el ojo humano. Durante la inspección visual, no se observa diferencia aparente entre PLA, PLA-ATBC y PLA-limoneno. Sin embargo al comparar PLA con PLA-PEG, se observa que este último presenta una ligera coloración blanquecina prácticamente despreciable.

CONCLUSIONES

Se han desarrollado materiales para su aplicación en el envasado de alimentos a partir de materiales biodegradables y autorizados para el contacto con alimentos. Se ensayaron tres plastificantes, dos de ellos frecuentemente utilizados para plastificar el PLA, ATBC y PEG. Se propone como alternativa al limoneno como un plastificante innovador, que cumple con los requisitos necesarios para la aplicación final: autorizado para el contacto con alimentos, biodegradable y compatible con la matriz polimérica. Además, otra ventaja del uso del limoneno como plastificante es la revalorización de un subproducto de la industria cítrica. La microscopía electrónica permitió observar que los plastificantes ATBC, PEG y Limoneno mostraron buena compatibilidad con la matriz polimérica del PLA, formando films homogéneos y sin separación de fases en todos los casos. Para evaluar la eficiencia de la plastificación de las nuevas formulaciones se realizaron ensayos mecánicos de tracción. Se observó un excelente equilibrio de propiedades mecánicas al plastificar PLA con ATBC, PEG y limoneno. La adición de los diferentes plastificantes en cada una de las formulaciones se caracterizó por una mejora en las propiedades dúctiles del material con un aumento en la elongación en el punto de rotura, además de a una reducción en el módulo elástico de Young y resistencia a la tracción. El PEG resultó el plastificante que menores cambios produjo en las propiedades mecánicas del material. Por su parte, ATBC resultó el plastificante más eficaz dado que produjo el mayor aumento de la ductilidad del PLA. Por su parte el limoneno aumentó significativamente las propiedades extensibles del PLA revelando valores comparables a los obtenidos con ATBC. Así mismo, se obtuvieron formulaciones con una elevada transparencia y prácticamente incoloras, siendo este un factor muy importante para un envase alimentario a la hora de ser elegido por el consumidor. Se puede concluir que el limoneno puede considerarse con un plastificante alternativo para la plastificación del PLA en la industria del envasado de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

Arrieta MP, Parres F, López J, Ferrándiz S, Navarro R. 2012. Pyrolysis of bioplastic wastes: Obtained products of poly(lactic acid) PLA. DYNA, 135 (3): 1511-1519.

Arrieta MP, Peltzer MA, Garrigos MC, Jiménez A. 2011. Biopelículas activas obtenidas a partir de proteínas lácteas. Envases alimentarios sostenibles. MAPFRE Seguridad y Medio Ambiente, 121: 46-56.

ASTM. 2001. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting, standards designation: D882-01. Philadelphia, USA.

Auras R, Harte B, Selke S. 2004. An overview of polylactides as packaging materials. Macromolecular Bioscience, 4(9): 835-864.

Averous L. 2004. Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: A review. Journal of Macromolecular Science-Polymer Reviews, C44 (3): 231-274.
Badía JD, Stromberg E, Ribes-Greus A, Karlsson S. 2011. Assessing the MALDI-TOF MS sample preparation procedure to analyze the influence of thermo-oxidative ageing and thermo-mechanical degradation on poly (Lactide). European Polymer Journal, 47 (7): 1416-1428.
Courgneau C, Domenek S, Guinault A, Averous L, Ducruet V. 2011. Analysis of the structure-properties relationships of different multiphase systems based on plasticized poly(lactic acid). Journal of Polymers and the Environment, 19 (2): 362-371.
FDA, A.U. Inventory of Effective Food Contact Substance (FCS) 2005; Available from: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=fcsListing&id=475
Fortunatia E, Armentanoa I, Zhou Q, Iannonia A, Saino E, Visai L, Berglundd LA, Kenny. 2012. Multifunctional bionanocomposite films of poly(lactic acid), cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. Carbohydrate Polymers, 87: 1596-1605.
Koller M, Salerno A, Dias M, Reiterer A, Braunegg G. 2010. Modern biotechnological polymer synthesis: a review. Food Technology and Biotechnology: 48(3):255-69.
Jamshidian M, Tehrany EA, Imran M, Jacquot M, Desobry S. 2010. Poly-lactic acid: production, applications, nanocomposites, and release studies. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9: 552-571.
Martino VP, Ruseckaite RA, Jiménez A. 2009. Processing and characterization of poly(lactic acid) films plasticized with commercial adipates. Journal of Applied Polymer Science, 112: 2010-2018.
Singh A, Kamal M. 2012. Synthesis and characterization of polylimonene: Polymer of an optically active terpene. Journal of Applied Polymer Science, 125 (2): 1456-1459.

AGRADECIMIENTOS

Marina P. Arrieta agradece a la Generalitat Valenciana por la beca otorgada para la formación del personal investigador en centros de investigación de la Comunitat Valenciana a través del programa Santiago Grisolía (GRISOLIA/2011/007). Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia de España a través del proyecto MAT2011-28468-C02-02.

Efecto protector de β-caroteno microencapsuado en goma arábiga sobre la fotooxidación de lípidos en leche

Boiero L.[1], Rodriguez-Estrada M.[2], Mandrioli M.[2], Montenegro M.[1,3], García N.[4]

1. Dpto. de Química, Facultad Regional Villa María, UTN, Villa María, Córdoba, Argentina.
2. Dpto de Ciencias de Alimentos. Universidad de Bologna, Bologna, Italia.
3. Inst. de Ciencias Básicas y Aplicadas, UNVM, Villa María, Córdoba, Argentina.
4. Dpto. de Química, UNRC, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
lboiero@frvm.utn.edu.ar

Resumen La leche es almacenada expuesta a luz fluorescente, para atraer la atención del consumidor. Esto puede desencadenar un proceso de fotosensibilización, afectando la calidad del alimento. En este trabajo, se estudió el efecto protector de β-caroteno microencapsulado en goma arábiga (Bc-GA) y el material de pared de la cápsula (GA), sobre las alteraciones nutricionales (oxidación de lípidos) y organolépticas (desarrollo de off-flavor), fotoinducidas en leche.
Los resultados obtenidos demuestran un % Inhibición en la formación de Sustancia Reactivas con Ácido Tiobarbitúrico (TBARs) máximo del 60% y del 50% por la adición de GA y Bc-GA, respectivamente, la Inhibición del Número de Peróxidos en Lípidos (POVs) fue del 35% por acción de la GA. Tanto GA como Bc-GA ejercen un efecto de inhibición sobre la producción de los volátiles mayoritarios con valores máximos entre 36 y 57%.
Este efecto protector de GA y Bc-GA puede deberse a la capacidad de desactivación de oxígeno molecular singulete ($^1O_2$), y especies Reactivas de Oxígeno (EROS) como el $OH^{\bullet}$, además de un efecto de filtro interno. Lo que indica que la adición de pequeñas cantidades de Bc-GA ejercerá un efecto protector sobre la fotooxidación de lípidos y el desarrollo de off-flavor en leche.

Palabras claves: Fotooxidación, carotenoides, fotoprotección, lípido, leche.

Abstract Milk it's stored exposed to fluorescent light, at the supermarket, to take attention from consumers. This can generate a photosensiblization process, affecting food's quality.
In this work, we studied the protective effect of β-carotene microencapsulated in gum arabic (Bc-GA) and the wall material (GA) on the nutritional alterations (lipid oxidation) and organoleptic (development of off-flavor), photoinduced in milk.
The results obtained show a maximum inhibition in the formation of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) % of 60% and 50% by the addition of GA and Bc-GA, respectively, the Inhibition of Number of Lipid Peroxides (POVs) was 35% by GA adding. Both GA and Bc-GA exert an inhibitory effect on volatiles production with higher values between 36 and 57%.
The protective effect of GA and Bc-GA capacity may be due to deactivation of singlet molecular oxygen ($^1O_2$), and reactive oxygen species (ROS) such as $HO^{\bullet}$, plus an internal filter effect. This indicate that the addition of small amounts of Bc-GA exert a protective effect on the photooxidation of lipids and the development of off-flavor in milk.

Keywords: Photooxidation, carotenoids, photoprotection, lipids, milk.

INTRODUCCIÓN

La oxidación de lípidos es un proceso complejo, que lleva a la formación de diferentes compuestos. En estadíos tempranos, ocurre una oxidación primaria, formando hidroperóxidos alquílicos como productos. Sin embargo, estos hidroperóxidos son inestables, por lo que se descomponen en una variedad de productos de oxidación secundarios, tales como hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, alguno de los cuales sufren reacciones como ruptura, generando compuestos de menor peso molecular (Gunstone *et al.* 2007). Esta es promovida por iniciadores como, elevadas temperaturas, irradiación UV-Visible, oxígeno y metales. En el proceso de fotooxidación, está involucrado un sensibilizador (S), el cual es un compuesto que posee la capacidad de absorber radiación UV cercana y luz visible azul (λ < 500 nm) generando un estado singulete excitado ($^1S^*$) (Skibsted 2010). En la leche, está involucrada la Riboflavina (Rf) como un sensibilizador, la cual absorbe luz, para formar el estado triplete excitado ($^3Rf^*$), que reacciona con componentes de la leche en

presencia de oxígeno, generando especies reactivas de oxigeno (EROS), tales como: radicales hidroxilo ($HO^{\bullet}$), peroxilo ($HOO^{\bullet}$), anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) y oxígeno molecular singulete ($^1O_2$). Estas especies pueden causar oxidación de vitaminas y lípidos, con producción de compuestos volátiles de bajo peso molecular, responsables de off-flavour, generando alteración de la calidad nutricional y flavor de la leche, haciéndola menos aceptable para los consumidores.

El efecto perjudicial de las EROS en alimentos, y seres vivos es balanceado por un sistema de defensa antioxidante, endógeno o exógeno, que por desactivación de radicales libres, previene el daño oxidativo y en consecuencia, el desarrollo de enfermedades tales como cáncer, arteriosclerosis y artritis, entre otras (Halliwell 1999). La leche y los productos lácteos, poseen protección natural contra las degradaciones oxidativas, desarrollada por componentes minoritarios con actividad biológica tales como enzimas, carotenoides y vitaminas. Sin embargo, en muchos casos, estos componentes ¨protectores¨ son perdidos durante el procesamiento y almacenamiento. Por esta razón, una manera de prevenir el deterioro en la calidad de los alimentos, es la adición exógena de compuestos con actividad antioxidante.

La tendencia actual es la de emplear antioxidantes (AOx) de origen natural, debido a los posibles efectos perjudiciales presentados por los AOx sintéticos tradicionalmente utilizados en la industria de alimentos. En tal sentido, los carotenoides son importantes AOx naturales, ya que son eficientes desactivadores de EROS, protegiendo a compuestos biológicos de la acción dañina de las mismas (Liebler 1993, Montenegro *et al.* 2001, Montenegro *et al.* 2004, Palozza 1992). Sin embargo, debido a la estructura química altamente reactiva e hidrofóbica de los carotenoides, una manera de estabilizarlos y solubilizarlos en matrices acuosas para su empleo como AOx en medios biológicos, es la microencapsulación con biopolímeros. Comúnmente, para su adición en alimentos, se utilizan polisacáridos comestibles, tales como goma arábica, maltodextrinas, etc. generando una pared que recubre y protege al carotenoide (Barbosa *et al.* 2005, Shu *et al.* 2006, Borgogna *et al.* 2010).

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto protector de β-caroteno microencapsulado en goma arábiga (Bc-GA) y el material de pared de la cápsula (GA), sobre las alteraciones nutricionales (oxidación de lípidos) y organolépticas (desarrollo de off-flavor), fotoinducidas en leche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de leche

Se realizaron ensayos de fotodegradación de muestra de leche en polvo entera, reconstituida según indicación del fabricante, colocando fracciones medidas (500 mL) en frascos de vidrio (corte en $\lambda < 310$ nm), con y sin adición Bc-GA y GA, almacenadas a temperatura de 4°C bajo iluminación con lámparas fluorescentes, en ciclos discontinuos de luz y oscuridad, durante 7 días, simulando las condiciones de almacenamiento en góndola. En las mismas condiciones se realizó un control, manteniéndolo en oscuridad. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

Determinación de oxidación lipídica en leche.

Determinación de sustancia reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARs)

La metodología aplicada se basa en la medida espectrofotométrica del pigmento rosado generado por la reacción producida entre ácido tiobarbitúrico (TBA) y productos de oxidación de ácidos grasos insaturados, tales como malonaldehído, de acuerdo al método descripto por Tarladgis *et al.* 1960.

La concentración de TBARs, se expresa en mg de malonaldehído (MDA) por Kg de muestra, calculado a través de la ec. 1.

$$mg_{MDA/Kg} = \left(\frac{Abs + a}{b} \right) . \frac{10^{-10} \times 72{,}06 \times 10^{6} \times 10}{W_{muestra}} \qquad (1)$$

Donde **Abs** corresponde a la absorbancia obtenida de la muestra, **a** es la intersección de la curva de calibración, y **b** es la pendiente de la misma. $\mathbf{W_{muestra}}$ corresponde al peso de la muestra, **72,06** es el peso molecular de MDA, **10** el volumen final adicionado y $\mathbf{10^6}$ es el factor de conversión.

Determinación del número de peróxidos en lípidos (POVs)

La determinación se llevó a cabo a través del método propuesto por Shantha y Decker 1994, basado en la capacidad de los peróxidos de oxidar el ión ferroso a ión férrico, el cual forma un complejo coloreado con

tiocianato de amonio, cuyo máximo de absorción se mide espectrofotométricamente a 500 nm, comparando con un blanco. El valor de peróxidos se calcula a través de la ec.2. Este valor es un útil indicador de la peroxidación lipídica.

$$POVs = \frac{(A_s - A_b) \times (1/m)}{55,4 \times m_0 \times 2} \quad (2)$$

Determinación de compuestos volátiles en leche:
Los compuestos volátiles que contribuyen al desarrollo de sabores indeseables en leche bajo reacciones fotoinducidas, fueron determinados por microextracción en fase sólida (SPME) y detectados por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría masa (GC-MS), según el método propuesto por Marsilli 1999, levemente modificado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
La degradación de ácidos grasos poliinsaturados contribuye a la disminución de la vida media de los productos alimenticios, formando una gran variedad de compuestos (Allen 1987). Algunos de los efectos perjudiciales incluyen, desarrollo de off-flavours y aromas indeseables, cambios en la textura y pérdida del valor nutricional. Además, los productos de la peroxidación lipídica parecen estar directamente relacionados con el desarrollo de enfermedades como aterosclerosis, cáncer y procesos de envejecimiento (Rice-Evans y Burdon 1993).

Determinación de sustancia reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARs).
Los resultados de la cuantificación de las sustancias reactivas con TBA, expresados como mg MDA/Kg muestra de leche, con y sin adición de GA y Bc-GA, a diferentes intervalos de tiempo de exposición a condiciones de luz y oscuridad a 4 °C durante 7 días, se muestran en la Figura 1.

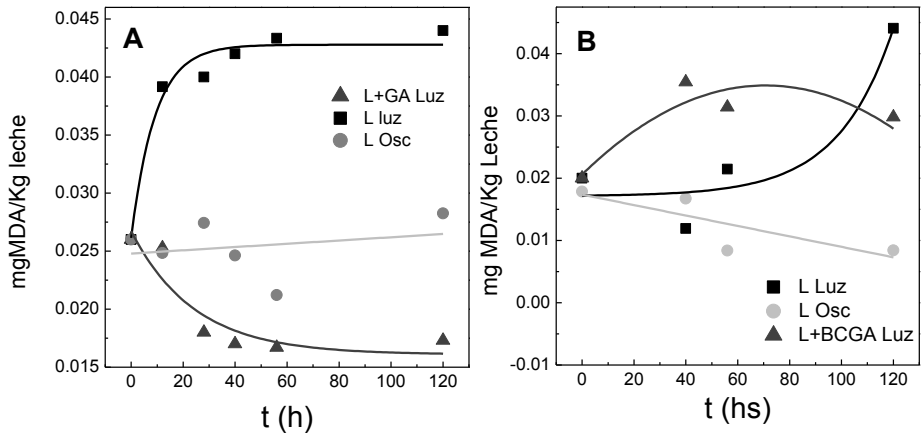


Figura 1. Concentración de TBARs, (mg MDA/Kg muestra) en leche con y sin adición de GA (A) y Bc-GA (B), a diferentes intervalos de tiempo de exposición a condiciones de luz y oscuridad a 4 °C.

Como se puede observar, la formación de TBARs en leche en oscuridad fue prácticamente nula. En leche expuesta a condiciones de iluminación a 4 °C durante 120 h, sin adición de GA o Bc-GA se observó un incremento en la concentración de los productos de oxidación TBARs, mientras que con la adición de GA o Bc-GA, hubo una disminución de la misma, siendo mayor para el caso de GA. Esto nos indica un efecto benéfico de la GA y de Bc-GA sobre la oxidación de lípidos de la leche. Para evaluar el grado de dicha acción, se determinó el porcentaje de inhibición de la formación de TBARs (% I_{TBARs}), empleando la ec. 3

$$\%\, I_{TBARs} = \left(\frac{TBAR_L - TBAR_{L+AOx}}{TBAR_L} \right) \times 100 \quad (3)$$

Donde $TBAR_L$ es la concentración de TBARs formada en leche expuesta a iluminación sin adición de AOx, y $TBAR_{L+AOx}$ es la concentración de TBARs formada en leche expuesta a la luz, con adición de Bc-GA o GA.
Los valores de % I_{TBARs} indican que la GA adicionada a la leche, sometida a condiciones de iluminación, ejerce una inhibición máxima sobre la formación de TBARs aproximadamente del 60% a partir de las 25 hs de exposición, y dicho efecto se mantiene constante a mayores tiempos de fotodegradación. Mientras que para el caso de Bc-GA, se observa una disminución en la formación de TBARs, aunque principalmente a tiempos más prolongados de exposición a la luz, con un porcentaje de inhibición máximo cercano al 50% a las 120 hs.
El efecto fotoprotector de GA y Bc-GA sobre la formación de TBARs en leche puede deberse a la capacidad de inhibir la EROS, en particular $HO^{\bullet}$, el cual es uno de los principales radicales involucrados en la oxidación lipídica, actuando como iniciador (Faria *et al.* 2010, Boiero *et al.* 2012). Además, el biopolímero GA por su composición aminoacídica, tiene la capacidad de desactivar especies radicalarias oxidantes (Montenegro *et al.* 2012).

Determinación del número de peróxidos en lípidos.
A través de mediciones espectrofotométricas, se determinó el número de peróxidos, expresados como meq de O_2/Kg lípido, en leche con y sin adición de GA, almacenada a 4 °C durante 7 días, bajo condiciones de luz y oscuridad, Figura 2 (A). El tratamiento de leche con adición de GA mantenido al resguardo de la luz a 4 °C (L+GA Osc), permitió comprobar que en la formación de POVs no está involucrada la temperatura, sino que su desarrollo se debe principalmente a la fotoinducción (Resultados no mostrados). Se empleó leche sin adición de GA como control en oscuridad.

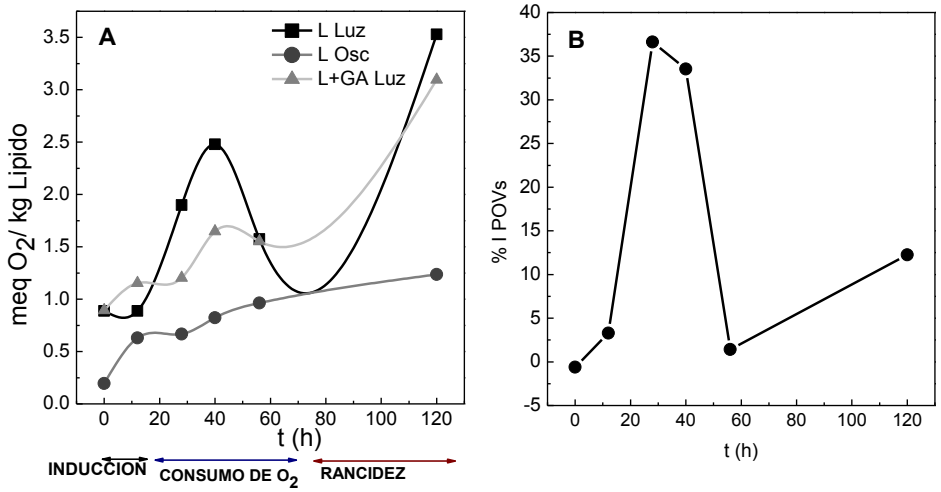


Figura 2. (A) Número de peróxidos, expresados como meq de O_2/Kg lípido, extraídos de leche con y sin adición de GA, almacenada a 4 °C, bajo condiciones de luz y oscuridad. (B) Porcentaje de inhibición de formación de POVs en lípidos extraído de leche con GA adicionada, respecto de leche sin adición, en condiciones de iluminación.

En la Figura 2A, se puede observar que la formación de peróxidos transcurre básicamente por tres etapas. Siendo la primera una inducción, con formación de los radicales iniciadores. Seguido de un consumo bimolecular de O_2, observándose la máxima formación de POVs durante esta etapa de propagación. Se observa claramente una reducción en la formación de peróxidos en la fracción lipídica obtenida de leche en presencia de GA. Inmediatamente posterior, se produce una marcada disminución del número de POVs, lo que es justificado por la inestabilidad y rápida degradación de los hidroperóxidos primarios formados, para dar origen a una amplia variedad de productos de oxidación secundarios, indicando el comienzo de la rancidez oxidativa. Se puede observar que la formación de POVs se ve disminuida en leche expuesta a iluminación con la adición de GA. A partir de dichos resultados, se calculó el porcentaje de inhibición de la formación de peróxidos en lípidos de leche con GA (% IPOVs GA), en función POVs formados en lípidos de leche sin adición de GA, a cada intervalo de exposición a la luz, según la ec. 4.

$$\%\, I_{POVs} = \left(\frac{POV_L - POV_{L+AOx}}{POV_L} \right) \times 100 \qquad (4)$$

Donde POV_L es la concentración de peróxidos, expresados como meq de O_2/Kg lípido, formados en leche sin GA durante exposición a iluminación a 4 °C, y POV_{L+GA} es la concentración de peróxidos, expresados como meq de O_2/Kg lípido, formados en leche con GA durante exposición a iluminación a 4 °C.
En la Figura 2B se observa claramente un máximo efecto de inhibición de la peroxidación lipídica por la GA, entre las 20 y 40 hs de iluminación de la leche, de alrededor del 35%.
Numerosos estudios han demostrado que la aplicación de GA está relacionada con una disminución del estrés oxidativo, lo que estaría sustentado principalmente por su capacidad de desactivar EROS. Las propiedades antioxidantes de GA pueden estar asociadas a la fracción proteica que la compone, principalmente a residuos de aminoácidos tales como, histidina, tirosina y lisina, los cuales son considerados generalmente como antioxidantes (Marcuse 1960, Marcuse 1962, Park *et al.* 2005).

Determinación de compuestos volátiles en leche.
El desarrollo de off-flavors inducido por la luz, está estrechamente relacionado con procesos de fotosensitización. La presencia de fotosensitizadores acelera las reacciones de oxidación de constituyentes como aminoácidos, y ácidos grasos insaturados (Choe y Min 2005). Los ácidos grasos de cadena corta y mediana (C_4 a C_{12}) son responsables del desarrollo de ciertos sabores, tales como jabón, rancidez, astringencia. Además, estos ácidos grasos son precursores de reacciones de oxidación, generando aldehídos y cetonas, que son los responsables de sabores desagradables en la leche en polvo (IDF 1991).
En la determinación de los compuestos volátiles presentes en leche entera durante el almacenamiento en las condiciones antes mencionadas, con y sin adición de GA y Bc-GA, una gran variedad de volátiles fueron detectados, incluyendo entre ellos hidrocarburos, aldehídos, cetonas y alcoholes. En la Tabla 1, se informa el contenido porcentual de los compuestos volátiles detectados en muestras de leche con la adición de GA y Bc-GA a un tiempo de 50 h de exposición a la luz, en el cual se observó el máximo porcentaje.
Entre los compuestos volátiles más abundantes generados en leche se encuentran hexanal, propanal, pentanal, y heptanal. Usualmente estos compuestos son utilizados como indicadores para la oxidación lipídica avanzada.

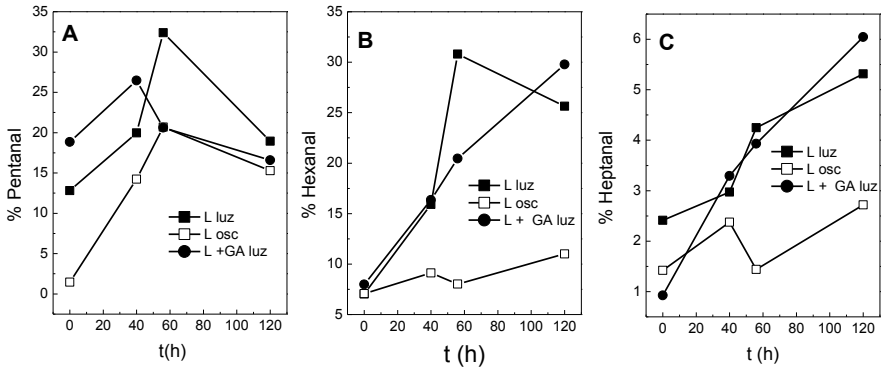


Figura 3. % de volátiles, producidos en leche con y sin adición de GA, expuesta a 4 °C. (A) pentanal, (B) hexanal, (C) heptanal.

En la Figura 3 se representa el % de los principales volátiles formados en leche, con y sin adición de GA, durante el almacenamiento en las condiciones antes mencionadas.
Como se puede observar en la Figura 3, el control en oscuridad prácticamente no presenta formación de volátiles comparado a los tratamientos expuestos a la luz. Además a 50 hs de exposición a luz, se observan porcentajes de inhibición en los volátiles que oscilan entre 5-36 % por la adición de GA, Tabla 1. Este efecto se puede deber a la capacidad de la GA de desactivar el estado triplete excitado de $^3Rf^*$, el $^1O_2$, y la capacidad antiradicalaria frente a otras EROS como es el $HO^\bullet$, lo que reduce el ataque de dichas especies oxidantes a los altamente eletrofílicos ácidos grasos insaturados, y en consecuencia, se reduce la formación de volátiles causantes de off-flavor en la leche.

Tabla 1. % de volátiles generados y % de Inhibición en la generación de los mismos durante el almacenamiento a 4°C bajo 50 h de iluminación en leche con la adición de GA y Bc-GA.

COMPUESTOS	**L+GA LUZ**		**L+BCGA LUZ**	
	% Volátiles	**% Inh**	**% Volátiles**	**% Inh**
Acetone	3,25	NI	1,01	57,44
2-Butanone		23,61	0,31	54,28
3-methyl- Butanal			0,43	NI
2-Pentanone	1,17	NI	2,88	NI
Pentanal	26,46	36,37	16,44	33,96
Hexanal	16,36	33,60	42,78	NI
2-Heptanone	21,75	NI	12,20	12,35
Heptanal	3,29	NI	14,31	NI
2-Hexenal			0,59	44,86
1-Pentanol	5,70	5,25	2,44	40,93
Octanal	2,70		1,33	48,17
1-Octen-3-one			1,04	20,94
(Z)-2-Heptenal	10,08		6,41	8,15
2,3-Octanedione	2,00		2,03	0,34
1-Hexanol			0,72	2,42
2-Nonanone	3,91	5,67		
Nonanal	0,85			
2-methyl-1-Butanol	1,42			

Estudios recientes mostraron que los compuestos volátiles son detectados en muestras de leches almacenadas solo bajo condiciones de iluminación, mientras que no hubo desarrollo en aquellas almacenadas en oscuridad durante 8 hs (Lee y Min 2009). Dicho incremento de volátiles en leche bajo la exposición a la luz, implica la presencia de un mecanismo fotosensibilizado, que causa la oxidación.

La bibliografía indica que el orden de formación de volátiles en leche fotosensibilizada sería hexanal, pentanal, heptanal, y dimetil sulfuro, respecto al tiempo de almacenamiento y concentración.

Los principales ácidos grasos que componen la grasa de la leche son: ácido mirístico (C 14:0) ~12%, palmítico (C 16:0) 43,7%, esteárico (C 18:0) 11,3%, oleico (C 18:1) 11,3%, y linoleico (C 18:2) 1,5%. El hexanal y el pentanal son volátiles productos de oxidación de ácidos grasos poliinsaturados *n – 6.* Yang *et al*. 2007, demostraron que pentanal, hexanal y heptanal fueron detectados en sistemas modelos de ácido linoleico, tratados por autooxidación y oxidación fotosensitizada de Rf. En otro estudio realizado, se demostró que heptanal fue uno de los volátiles más importantes obtenido de lípidos estructurados, conteniendo ácido linoleico conjugado y ácido oleico (Timm-Heinrich *et al.* 2004).

La Figura 4, muestra los % de principales volátiles generados en muestras de leche en presencia de Bc-GA.

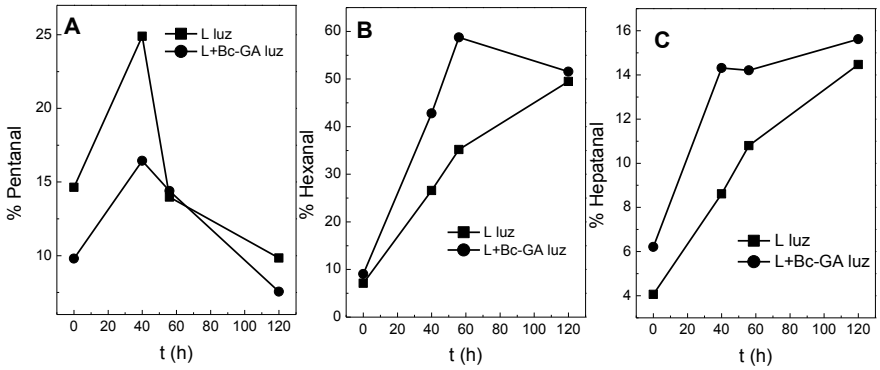


Figura 4. % de volátiles, producidos en leche con y sin adición de Bc-GA, expuesta a luz a 4 °C. (A) pentanal, (B) hexanal, (C) heptanal,

Para el caso de Bc-GA se observa que hay efecto de inhibición sobre la formación de algunos compuestos volátiles con % de inhibición entre 1-57 %, mientras que para otros el efecto de la adición de Bc-GA es negativo, generándose una mayor cantidad de los mismos, Tabla 1. Este efecto negativo podría deberse a la generación de compuestos volátiles a partir de la oxidación, tanto de β-caroteno como de GA.

La función del β-caroteno en el off-flavor de leche y productos lácteos oxidados aún no se ha dilucidado. Sin embargo, estudios realizados informan la formación de compuestos volátiles cuando se produce la autooxidación de β-caroteno. Chiva 1966, analizó los compuestos volátiles producidos de la autooxidación de β-caroteno, identificando volátiles como n-pentano, etil éter, acetaldehído, acetona, propanal, tolueno, isobutanal, 2-octanona, 2-pentanona, 4-methil-3-pentan-2-ona, 1, 1, 3-trimetil-2-n-propilciclohexano, 2-metil-3-noneno y 3, 5, 5-trimetil-4-(4'-butil- 3'-en-2'-onil)ciclohexa-1, 3-diene. Una fracción que posee un fuerte aroma a nueces fue presuntamente identificada como 2-metil-2-heptenal. Todos estos compuestos volátiles identificados pueden ser predichos como productos de degradación de la oxidación de β-caroteno.

CONCLUSIONES

Frente a la oxidación lipídica fotoinducida de leche, la cual genera productos de oxidación y off-flavors, se determinó el efecto fotoprotector de GA y Bc-GA por la inhibición de la formación de TBARs en leche de alrededor de 55%, y la inhibición de la formación de peróxidos por la GA del 35%, lo que puede deberse a la capacidad de ambos en desactivar EROS, en particular $HO^{\bullet}$, el cual es uno de los principales radicales involucrados en la oxidación lipídica, actuando como iniciador de la misma. Con respecto a la generación de compuestos volátiles, se observa que tanto GA como Bc-GA ejercen un efecto de inhibición sobre la producción de algunos volátiles con valores máximos entre 36 y 57%, mientras que para otros se observan contenidos mayores. Cabe destacar que el efecto inhibitorio es máximo en los compuestos de mayor importancia en cuanto a la generación de off-flavors en la leche.

Tales efectos también pueden ser explicados por la capacidad de desactivación de $^1O_2$ mostrada tanto por Bc-GA como por GA, (mayor en Bc-GA, ya que β-caroteno es un excelente desactivante de $^1O_2$) ya que ésta especie es altamente electrofílica, capaz de reaccionar con moléculas ricas en electrones, tales como las dobles ligaduras de los lípidos insaturados, vitaminas y proteínas. Además, la desactivación del $^3Rf^*$ causada por GA aun en presencia de oxígeno, reduciendo la concentración de EROS generadas. Un mecanismo de fotoprotección adicional que podría estar involucrado, por un efecto de filtro interno que ejercería, tanto GA como Bc-GA, por la absorción de parte de la radiación emitida por la lámpara fluorescente, evitando de este modo la formación del estado triplete excitado de $^3Rf^*$.

En base a todo los resultados obtenidos, se puede concluir que los carotenoides, y en particular β-caroteno microencapsulados en GA, poseen un efecto protector sobre las alteraciones nutricionales (oxidación de lípidos) y organolépticas (desarrollo de off-flavor) en leche durante el almacenamiento inducidas por iluminación.

BIBLIOGRAFÍA

Allen JC. 1987. Industrial aspects of lipid oxidation. Eds: Hamilton RJ, Bhati A. In recent advances in chemistry and technology of fats and oils. London, U.K.: Elsevier, 31-39.

Barbosa MI, Borsarelli CD, Mercadante AZ. 2005. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. Food Research International, 38: 989-994.
Boiero ML, Vanden Braber N, Comba N, Borsarelli CD, Montenegro MA. 2012. Carotenoides microencapsulados como desactivantes de especies reactivas de oxígeno. The journal of Argentine Chemical Society XXIX Congreso Argentino de Química. Vol. 99 (1-2). ISSN: 1852-1207.
Borgogna M, Bellich B, Zorzin L, Lapasin R, Cesàro A. 2010. Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. Food Chemistry, 122: 416-423.
Chiba N. 1966. Oxidative degradation of beta-carotene. Abstract of Food Science Thesis, 1-105.
Choe EO, Min DM. 2005. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. Journal of Food Science, 70: 142–59.
Faria AF, Mignone RA, Montenegro MA, Mercadante AZ, Borsarelli CD. 2010. Characterization and singlet oxygen quenching ability of spray-dried microcapsules of edible biopolymers containing antioxidant molecules. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58: 8004-8011.
Gunstone FD, Harwood JL, Dijkstra AJ. 2007. The lipid handbook with CD-ROM. 3rd ed. United States of America. CRC Press Taylor &Francis Group. ISBN-13: 978-0-8493-9688-5.
Halliwell JMC. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3er ed. Oxford University Press.
IDF. 1991. Determination of free fatty acids in milk and milk products. *Bulletin FIL – IDF No 265*. Brussels: International Dairy Federation,
Lee JH, Min DB. 2009. Changes of headspace volatiles in milk with riboflavin photosensitization. Journal of Food Science. 74: 7.
Liebler DC. 1993. Antioxidant reactions of carotenoids. Annals of the New York Academy of Sciences, 691: 20-31.
Marcuse R. 1960. Antioxidative effect of amino-acids. Nature, 186: 886-887.
Marcuse R. 1962. The effect of some amino acids on the oxidation of linoleic acid and its methyl ester. The Journal of the American Oil Chemists Society, 39: 97-103.
Marsili RT. 1999. Comparison of solid-phase microextraction and dynamic headspace methods for the GC-MS analysis of light-induced lipid oxidation products in milk. Journal of Chromatographic Science, 37, 1: 17–23.
Montenegro MA, Boiero ML, Valle L, Borsarelli CD. 2012. Gum arabic: more than an edible emulsifier. En: Products and Applications of Biopolymers. Ed. Johan Verbeek. ISBN: 978-953-51-0226-7, InTech.
Montenegro MA, Nazareno MA, Durantini EN, Borsarelli CD. 2001. Singlet oxygen quenching ability of carotenoids in a reverse micelle membrane mimetic system. Photochemical Photobiological Sciences, 75: 353-361.
Montenegro MA, Rios de O A, Mercadante AZ, Borsarelli CD. 2004. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. Journal of Agriculture Food Chemistry, 52: 367-373.
Palozza P, Krinsky NI. 1992. Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro. Journal Methods in Enzymology, 213: 403.
Park EY, Murakami H, Matsumura Y. 2005. Effects of the addition of amino acids and peptides on lipid oxidation in a powdery model system. Journal of Agricultural and Food Chemistry, *53*: 8334-8341.
Rice-Evans C, Burdon R. 1993. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. Progress in Lipid Research, 32, 1: 71-110.
Shantha NC, Decker E. 1994. A rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. Journal of AOAC International 77, 2: 421-424.
Shu B, Yu W, Zhao Y, Liu X. 2006. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. Journal Food Engineering, 76: 664-669.
Skibsted LH. 2010. In oxidation in foods and beverages and antioxidants applications. Decker EA, Elia RJ, McClements D, Eds. Understanding oxidation process in foods. Vol I. Woodhead Publishing. Oxford. Pág. 3-35.
Tarladgis BS, Watts BM, Younathan MT. 1960. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. The Journal of the American Oil Chemists Society, 37: 44-48.
Timm-Heinrich M, Nielsen NS, Xu X, Jacobsen C. 2004. Oxidative stability of structured lipids containing C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 or CLA in sn2-position as bulk lipids and in milk drinks. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 5 (2): 249–61.

Yang SO, Lee JM, Lee JC, Lee JH. 2007. Effects of riboflavin-photosensitization on the formation of volatiles in linoleic acid model systems with sodium azide or D_2O. Food Chemistry, 105:1375–81.

AGRADECIMIENTOS
Al apoyo económico del CONICET, SCyT-UTN, SCyT-UNSE, SCyT-UNRC, todos de Argentina, y el apoyo económico de Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, RFO Proyecto 2010.

Protocolo de elaboración y conservación artesanal de cuajo de Cabrito

Bonafede M.[1], Aimar B.[1], Nieto I.[1], Picotti J.[1], Molina Ortiz S.E[2].

1: INTI Lácteos Rafaela
2: INTI UE sede Cruz del Eje, Centro regional Córdoba
bonafede@inti.gob.ar

Resumen: Según lo observado, en las prácticas tradicionales de los elaboradores artesanales de quesos localizados al noroeste de la provincia de Córdoba, se detectó la necesidad de redactar un protocolo que contenga la preparación del cuajo natural de cabra. Éste protocolo tiene en cuenta todos los aspectos tradicionales que han sido transmitidos entre las diferentes generaciones como receta típica para la elaboración de "quesillo". En éste estudio fueron evaluados aspectos tecnológicos y microbiológicos con el fin de introducir en los procedimientos típicos el mejoramiento de la calidad y garantizar la seguridad en la producción de los quesos artesanales. Durante éste estudio se llevaron adelante investigaciones para determinar la composición físico-química y propiedades microbiológicas del cuajo natural de cabra. Los resultados obtenidos nos permiten confeccionar un protocolo con doce pasos básicos como una guía para la elaboración típica del "quesillo".

Palabras clave: cuajo, conservación, salado

Abstract: According to the evidence of the traditional practice of handcrafted cheeses producers located in Northwest of Cordoba province it was detected the necessity to redact a protocol which include the preparation of natural goat rennet. This protocol considers some traditional aspects which were transmitted between different generations as typical recipes to make "quesillo". In this study we evaluated technological and microbiological aspect in order to introduce them in the typical recipes to improve it quality and to guarantee the safety production of handcrafted cheeses. During this study laboratory probe were carried out to determinate the physicochemical composition and the microbiological properties of the natural goat rennet. The results obtained allow us to prepare a specific protocol considering twelve basic steps as a guide to make typical recipes of "quesillo".

Key words: rennet; conservation; salty.

INTRODUCCIÓN

La cabra es una especie productora de leche, aunque también productora de carne, cuero y fibra y se destaca por ser un animal rústico, precoz, de gran adaptabilidad y docilidad para su manejo. El ganado caprino se encuentra donde las demás especies no son factibles para su explotación, transformando recursos de baja calidad y cantidad, en carne, cuero, pelo y leche. Es una producción muy asociada a economías regionales y en algunos casos podría llamarse marginales, ya que la actividad caprina se desarrolla bajo un modelo de producción que es el de subsistencia de las familias productoras.Estas producciones se encuentran distribuidas en el centro-oeste, sur y al norte del territorio nacional. Las majadas de los pequeños productores familiares están compuestas generalmente, por unas 80 a 100 cabras por productor. La producción tiene un destino predominante a carne, produciendo cabrito mamón hasta unos 8 a 10 kilos vivo, que tiene un rendimiento al gancho de un 53% con una edad que va de 30 a 90 días. (Trezeguet 2010). Sin embargo la cabra, una vez faenado el cabrito mamón, queda con leche, que en ocasiones es aprovechada para la elaboración del subproducto típico del NOA Argentino, como así también del noroeste Cordobés, "el quesillo".

En éste tipo de producciones a escalas artesanales como lo es la elaboración de quesillo, generalmente se utilizan insumos caseros como es el caso del cuajo de cabrito utilizado como cuajo fermento. Todos estos procedimientos que han sido transmitidos de generación en generación y que hoy en día, van perdiendo su utilización, porque va siendo reemplazado por el uso de cuajos elaborados a escala industrial, ya sean de origen animal, vegetal o de origen recombinante. En la práctica no solo supone el reemplazo de un insumo por otro, sino que se van dejando de lado saberes ancestrales, propios de cada una de las regiones antes mencionadas y que hacen a la cultura de éstas y a los productos típicos encontrados en ellas, propios de esos conocimientos logrados a través de tantos años de interacción del hombre con su medio.-

El objetivo de nuestro trabajo fue determinar los parámetros físico-químicos y microbiológicos óptimos para la elaboración de cuajo – fermento natural de cabrito, estableciendo un protocolo de elaboración que respete las tradiciones de usar insumos naturales regionales, en condiciones de inocuidad alimentaria, en la elaboración del quesillo elaborado en el Noroeste Cordobés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Encuestas

Se efectuó una encuesta a campo a unos 20 productores, de distintas localidades del noroeste de la provincia de Córdoba, donde se pregunto sobre la forma de producción que cada uno lleva adelante en lo que hace a producción caprina, y si es que elaboran el cuajo como insumo básico para la elaboración del quesillo. Se analizaron las distintas metodologías de elaboración de cuajo artesanal y a partir de éstas se definieron pautas mínimas para mantener la inocuidad del cuajo.

Muestras

Sobre dos muestras de cuajo, provenientes del norte Córdoba que fueron rehidratadas en suero de quesería, se realizaron ensayos fisicoquímicos y microbiológicos. Al suero dulce de quesería se le realizaron las siguientes determinaciones: Materia grasa: FIL/IDF 22B:1987 Röse Gottliebe; Proteínas ISO 8968-2 IDF 20-2 Kjeldahl; Sólidos Totales IDF 21B:1987; Cenizas AOAC 945.46; Lactosa calculada por diferencia.

Determinaciones

Investigadores de la UNNE, Corrientes, trabajaron sobre la caracterización del agente coagulante, de quesos artesanales de Corrientes (Coronel G y otros). Se rehidrataron dos muestras de cuajo en suero dulce de quesería de conocida composición, y se efectuaron análisis fisicoquímicos de pH, Acidez titulable en función del tiempo y se midió el poder coagulante de los mismos.-

Por otro lado se realizaron ensayos microbiológicos Recuento de coliformes y Escherichia coli: Método de film seco rehidratable - PETRIFILM TM Tiempo y temperatura de incubación: 48 ± 2 hs / 35 ± 1ºC (según AOAC) Recuento de microorganismos a 30ºC : Norma ISO 4833: 2003- Método horizontal para la enumeración de microorganismos- Técnica de recuento a 30ºC, Recuento de bacterias lácticas (Lactobacilos y Streptococcos) según Norma ISO 7889/ FIL 117: 2003 Técnica de recuento de colonias a 37°C. Recuento de Enterobacteriaceae . Norma ISO 21528-2: 2004 – Método horizontal para la detección y enumeración método de recuento de colonias, recuento de estafilococos coagulasa positiva: Norma ISO 6888 -1: 1999 – Método horizontal para la enumeración de estafilococos coagulasa positiva –Técnica de recuento -l Amendment 2003, para determinar la calidad de los mismos como insumo básico en la elaboración de un alimento, como lo es el quesillo elaborado en la región del noroeste Argentino.

Muestra 1

La muestra uno pertenece a Lola Pacheco y es cuajo de cabrito mamón disecado a la sal, dicha muestra es proveniente de la cuenca productiva caprina San Pedro Gutenberg, provincia de Córdoba. La muestra de cuajo fue rehidratado en suero dulce de quesería y fue pasterizado 20 min/65°C, se guardo una relación del 5 % masa en volumen, pesando 24,8 g de cuajo/ 500 ml de suero.

Muestra 2

La muestra dos, pertenece a Patricia Galván y es de cuajo de cabrito mamón disecado a la sal, dicha muestra es proveniente de la cuenca productiva caprina San Pedro Gutenberg, provincia de Córdoba. La muestra de cuajo fue rehidratado en suero dulce de quesería y fue pasterizado 20 min/65, se guardo una relación del 5% masa en volumen, pesando 45 g de cuajo /900 ml de suero.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de la intervención territorial de INTI y observar las prácticas tradicionales de elaboración de quesos a escala artesanal de productores ubicados al noroeste de la provincia de Córdoba, se detecta la necesidad de obtener un "protocolo" de elaboración de cuajo natural de cabra, ajustando las practicas de elaboración del quesillo de cabra de dicha región, respetando las tradiciones de usar insumos naturales regionales en condiciones de inocuidad alimentaria.

La encuesta arrojo los siguientes datos: el 81% de los productores utiliza una metodología en común, donde al cuajo del animal una vez seco en sal es agregado en el suero fresco del quesillo recientemente elaborado,

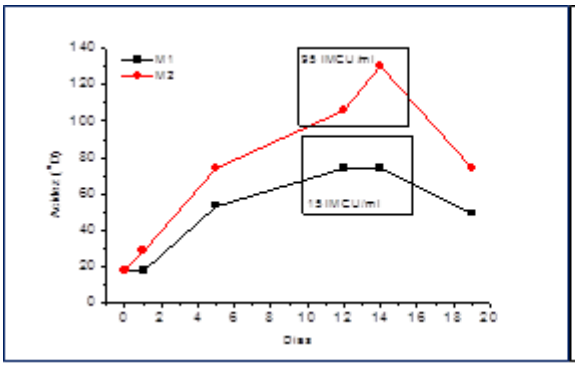
y a ésta mezcla (cuajo – fermento) se la utiliza como liquido coagulante. Otros productores (19%) utilizan agua con sal en lugar de suero fresco.
Para esto se aborda desde dos perspectivas: El tecnológico, donde el protocolo aportará a la producción de quesillo, condiciones de elaboración de cuajo que se puedan repetir en el tiempo, buscando obtener propiedades físico-químicas homogéneas, para lograr cuajos con buena aptitud tecnológica. El microbiológico, donde las características de éste producto deben cuidarse por cuestiones de inocuidad alimentaria. Por ello es fundamental buenas condiciones del suero donde se rehidratan los cuajos. Los resultados permitieron diseñar el siguiente protocolo: Faenar cabritos lactantes en condiciones de limpieza e higiene. Evitar la ruptura de órganos para evitar contaminar el cuajo al extraer vísceras, evitando que caigan al suelo. Obtener el cuajo sin mezclarlo con el resto de las vísceras. Cortar el cuajo y abrirlo. Lavar el cuajo con abundante agua limpia y de consumo familiar, en lo posible hacerlo con agua corriente, evitar lavar en un recipiente con agua estancada. El cuajo debe quedar limpio, en su totalidad. Utilizar sal gruesa, en cantidad suficiente como para cubrirlo de ambos lados. Una vez salado colgar en lugar seco y protegido del sol, evitar la presencia de insectos. Dejar por tres días o hasta que este seco. Utilizar dos frascos de 1 litro (de vidrio y boca ancha), lavarlo con poca cantidad de detergente y enjuagarlo bien. No utilizar lavandina. Usar inmediatamente el suero de la última elaboración de quesos en recipiente limpio y tapado. Es recomendable que, cuando se vaya a utilizar para el cuajo, calentar hasta antes de hervir. Si dispone de termómetro llevar a 65º durante 20 minutos. Dejar enfriar tapado hasta temperatura ambiente. Cortar el cuajo seco en dos mitades, poner cada una de ellas dentro de los frascos, agregar suero hasta completar los mismos. Agregar 1 cucharada sopera de sal gruesa. Tapar el frasco con tapa limpia. La cantidad de líquido a utilizar recomendable es de 1 o 2 cucharadas soperas por cada 20 litros de leche. No completar el frasco con suero nuevamente, se debe consumir en su totalidad. Luego se puede guardar en algún lugar oscuro, dejar las primeras 24 hs a temperatura ambiente y luego conservar en heladera por un periodo de hasta 1 mes. Es recomendable comenzar a utilizarlo 3 a 4 días después de la preparación. Este protocolo ha sido diseñado para ser entregado a los pequeños productores elaboradores de quesos artesanales.
Para la experiencia en laboratorio se utilizó suero dulce de quesería, entendiendo al suero como la fracción de la leche que no precipita frente a la acción del cuajo (quimosina) y que está formada por los componentes solubles de la leche (lactosa, sales y proteínas del suero). Éste ha sido estandarizado por nanofiltración, para rehidratar las muestras de cuajo, cuya composición química se presenta en la **Tabla1**.

Tabla 1. Composición fisicoquímica del suero dulce de quesería

Materia Grasa: 0,21 % p/v	Lactosa: 3,71 % p/v	pH 5,78
Proteína: 0,66 % p/v	Sólidos totales: 5,10 %p/v	Acidez 18 °D
Ceniza: 0,52 % p/v	Densidad: 1,020 g/ml	

Se estudio la evolución del pH y de la acidez titulable en función de los días muestreados. Midiendo la acidez titulable podemos observar el desarrollo de bacterias acidolacticas que generan acido láctico a partir del consumo de lactosa; midiendo el pH podemos observar la capacidad buffer de las proteínas del suero. Todos los valores obtenidos se hicieron por duplicado.
Se midió el poder coagulante de las muestras de cuajo 1 y 2, a los días 12 y 14 desde la preparación de los mismos, se consideraron estos días dentro del estudio por ser los que presentaron mayor acidez en ambas muestras. Los valores obtenidos fueron similares para ambos días, siendo de 15 y 95 IMCU/ml para las muestras 1 y 2, respectivamente siguiendo la técnica IDF 157 A / ISO 11815. 2007. Milk – determination of total milk clotting activity of bovine rennets.
El proceso se inicia con un pH cercano a 6 propio del suero dulce proveniente de quesería y éste disminuye con el tiempo transcurrido desde la preparación del cuajo hasta estabilizarse alrrededor de pH 4, en ambas muestras se observa lo mismo, debido a que hay una alta migración de iones en las primeras horas y luego con el transcurrir del tiempo se estabiliza debido a la capacidad buffer de ciertos componentes como lo son las proteínas del suero dulce de quesería.
En cambio se observa en las **Figuras 1 y 2** que la evolución de la acidez titulable presenta un aumento hasta alcanzar un máximo entre los días 12 y 14, disminuyendo posteriormente, ambas muestras presentan el mismo comportamiento esto indicaría que se debe al desarrollo de bacterias acidolacticas, donde se produce esta curva de acidez presentando un máximo para luego estabilizarse y posteriormente descender, siendo los valores máximos alcanzados de 74 y 106 ºD para las muestras 1 y 2 respectivamente, indicando la inhibición

y posterior reducción del número de recuento de bacterias acidolacticas, producido por la falta de lactosa del suero dulce de quesería, ya consumida por dichos microorganismos.-



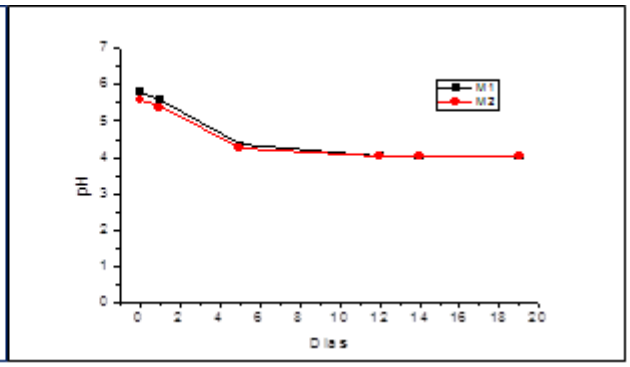


Figura1. Efecto del pH en la conservación de las muestras 1 y 2. **Figura2.** Efecto de la acidez y poder coagulante en el tiempo de conservación de las muestras 1 y 2.-

Estos resultados se reflejan en el protocolo ya que se puede observar que desde el punto microbiológico no existen tantos microorganismos contaminantes, ayudando a que haya una correcta fermentación del medio, logrando así un buen cuajo-fermento. A continuación se muestran en la **Tabla 2** los resultados del análisis microbiológico de ambas muestras en función del tiempo de conservación de los cuajos, se puede observar que los recuentos microbiológicos de bacterias patógenas presentan un marcado descenso y prácticamente desaparecen del medio con el correr de los días, dando una buena calidad microbiológica del cuajo fermento.
Por otra parte se observa un marcado crecimiento de las bacterias acido lácticas, que mejoran la acidez del medio inhibiendo la competencia a través de esto, ayudando así a una correcta fermentación en la elaboración de quesillo como estárter de la misma.-

Tabla 2. Recuentos microbiológicos en función del tiempo

Recuentos obtenidos	Día 2		Día 8		Día 20	
	Cuajo 1	Cuajo 2	Cuajo 1	Cuajo 2	Cuajo 1	Cuajo 2
Rec total	> 3.0 10^7	>3.0 10^7	1.9 10^8	1.7 10^8	2.1 10^7	9 10^6
Coliforme	>1.5 10^7	>1.5 10^7	6.6 10^4	1.7 10^2	<10	<10
E Coli	>1.5 10^7	>1.5 10^7	< 1	< 1	<10	<10
Enterobacterias	>1.5 10^7	>1.5 10^7	7.2 10^4	2.2 10^2	<10	<10
Moho y Levadura*	<100	<100	>1.5 10^4	>1.5 10^4	<1000	<1000
Lactobacilos	5.7 10^6	3.0 10^7	6 10^7	6 10^7	2.5 10^6	1.3 10^6
Estreptococos	1.9 10^9	2.4 10^8	4.3 10^6	3.8 10^4	2.9 10^6	5.1 10^5
Estafilo Coag +	<100	<100	<100	<100	<100	<100

Se realizo una combinación de parámetros entre la acidez y los resultados microbiológicos analizados en el suero obtenido de la preparación del cuajo. Para el recuento de Coliformes y E. Coli se muestra un recuento considerable desde el inicio de la experiencia, y a lo largo de los días de conservación el recuento desciende hasta desaparecer del medio producto de la acidez del mismo. El recuento de Estreptococos muestra en un alto recuento desde un principio igualándose en número con los lactobacilos en el día 8, hasta el día 20 de la experiencia. En general podemos mencionar que acidificado el medio (suero) no hay supervivencia de patógenos como es el caso de enterobacterias, solo los recuentos de hongos y levaduras son los que sobreviven al medio acido. A su vez se puede observar que presenta un alto valor de Streptococos al 2° día de haberse colocado el cuajo en suero, luego los recuentos se igualan desde el día 8 hasta el día 20.
Podemos concluir que:
Por lo tanto, el pH como la acidez titulable aumentan en las primeras 72 a 96 hs de preparado el cuajo en suero para luego estabilizarse lo que nos sugiere que ni bien se prepara el cuajo – fermento, éste necesita un tiempo de estacionado para alcanzar buenas aptitudes tecnológicas, como ser el poder coagulante del mismo que se ve optimizado por el rango acido que obtiene el suero con el correr de los días.
Por otro lado los recuentos microbiológicos obtenidos, nos muestran que una vez acidificado el medio aproximadamente 50 a 60 grados dornic, el índice de sobrevida de bacterias patógenas como Coliformes, E

coli, Enterobacterias y Estafilococo es nulo, solo hay supervivencia de hongos y levaduras lo que podría representar un potencial defecto tecnológico en el queso si dichos recuentos aumentaran significativamente.
En cuanto a las bacterias acido lácticas, a partir del cuarto o quinto día cuando se alcanzan los 60 grados dornic y donde se igualan el recuento de bacterias lácticas como estreptococos termófilos y lactobacilos, dando así una relación ideal desde el punto de vista tecnológico como fermento iniciador en el proceso de elaboración del quesillo elaborado en el Noroeste Cordobés.
A partir de las encuestas y los resultados de laboratorio, basados en las mejores condiciones fisicoquímicas y microbiológicas, se ha podido elaborar un protocolo para la elaboración y conservación de cuajo de cabrito.

BIBLIOGRAFÍA

Coronel G, Fusco A, Vasek O, Lopez Morales M. 1999. Quesos artesanales de Corrientes: Caracterización del Agente Coagulante. Material de la cátedra de Bromatología, facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. UNNE

FIL-IDF. 2007. Milk – determination of total milk clotting activity of bovine rennets. Norma FIL 157 A / ISO 11815:2007

Moschopoulou E. 2011. Characteristics of rennets and other enzymes from small ruminants used in cheese production. Journal Small ruminant Research 101, 188-195.

Trezeguet, M. 2010. Producción Caprina, primera edición. Vicente López, Buenos Aires. Pag 16-17

AGRADECIMIENTOS

Los datos y las muestras del presente trabajo fueron cedidos por productores caprinos de la cuenca láctea caprina de la Comuna de San Pedro Gutenberg: Mirta Moya – de la cuenca caprina de Santo Domingo; Josefina Quevedo – Serrezuela; Dominga Veas – de la localidad de San José de la Dormida; Sofía Teodora Castillo – Alto Flores, del Departamento de Tulumba; Juan Carrizo – del departamento de Ischillin; Mario Lopez – Sto Domingo, Rafael Martinez – de la localidad de Copacabana.-Sebastian Riera – del paraje de Los Leones (cuajo en agua, bórico y glicerina); Fabián Ramírez – de Villa del Soto (cuajo en agua c/sal); Patricia Galván – El Molle, de la comuna de Gutenberg (salados y ahumados); Erica Alvelo – de la comuna de Gutenberg; Lola Pacheco – Gutenberg ; Maria Mansilla – Ancas Mayo; Aguirre E – de Quilino; Jorge Luna – Las Chacras (queso duro de cabra); Iris Rodriguez – de la localidad San Carlos Minas.

Time-dependent crystallisation behaviour of freeze-dried amorphous lactose and trehalose systems modified by Prosopis ruscifolia and guar gums

Busch V. M.[1], Santagapita P. R. [1, 2], Buera M. P. [1, 2,*]

1. Departamentos de Industrias y Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
2. CONICET, Argentina.
pilar@di.fcen.uba.ar

Resumen La cristalización de azúcares en sistemas amorfos es de gran importancia práctica y económica en las industrias alimentaria y farmacéutica. Las semillas del árbol de vinal (*Prosopis ruscifolia*) tienen un interesante polímero o goma (VG) que podría ser utilizado como emulsionante, espesante o estabilizante para sustituir las gomas importadas como la goma guar (GG). Se realizó un análisis del comportamiento de las gomas VG y GG respecto a su efecto en la cinética de cristalización de lactosa y trehalosa en sistemas liofilizados expuestos a humedad relativa (HR) crítica. Las transiciones térmicas se determinaron por calorimetría diferencial de barrido (*DSC*) en corridas isotérmicas y dinámicas. La cinética de cristalización se evaluó a través de la ecuación de Avrami. La cristalización de lactosa y trehalosa en los sistemas expuestos a HR críticas se redujo por el agregado de VG y GG. Sin embargo, se observó una cinética de cristalización de la lactosa más rápida en los sistemas que contenían polímeros, además de presentar diferencias en los parámetros *n* y *k* de Avrami. Este trabajo muestra en sistemas modelo una prometedora aplicación potencial de un polímero proveniente de fuentes autóctonas como agente modificador de la cristalización de azúcares.

Palabras claves: cristalización, lactosa, trehalosa, DSC, goma guar, goma de vinal.

Abstract Crystallisation of amorphous sugars is of practical and economical importance in food and pharmaceutical industries. The seeds of *vinal* tree (*Prosopis ruscifolia*) have an interesting galactomannan gum that could be used as emulsifier, thickening or stabilizing agent to replace the actually imported guar gum (GG) and locust bean gum. The behaviour of *vinal* gum (VG) and GG to affect the crystallisation kinetics of lactose or trehalose freeze-dried systems subjected to humidification to critical relative humidity (RH) was analysed. Lactose and trehalose systems were exposed over saturated salt solution of 33% and 43% of RH, respectively. Thermal transitions (glass transition temperature -T_g-, sugar crystallisation and crystal melting) were determined by differential scanning calorimetry (DSC) in isothermal and dynamic runs. Avrami equation was used for kinetic crystallisation analysis. The amount of lactose and trehalose crystals in freeze-dried systems humidified at their critical RH was reduced by the presence of VG and GG. Nevertheless, the lactose-gum systems showed a faster kinetics of lactose crystallisation with changes in *n* and *k* Avrami parameters. The potential application of a novel gum obtained from local sources as a sugar crystallisation-modifier agent was promising.

Key words: crystallisation, lactose, trehalose, DSC, guar gum, *vinal* gum.

INTRODUCTION

Crystallisation of amorphous sugars is of practical and economical importance in food and pharmaceutical industries. The quality of dairy powders and dried products (in general basis) is affected by both processing methods and storage conditions. (Haque and Roos, 2006). Dehydrated lactose and dairy powders are hygroscopic and water sorption often promotes/unleashes reactions resulting in quality lost. Trehalose is worldwide used as excipient for dried pharmaceutical formulations and is increasingly used in food bakery products, in sports beverages as well as in a good variety of products for diabetics (Richards *et al.* 2002). Crystallisation of amorphous sugars in foods may enhance both physical and chemical deterioration. Then, the presence of a second excipient is generally required to avoid/ delay crystallisation and increase the overall stability (Buera *et al*. 2005). Several authors have indicated that the presence of a polymer changed the crystallisation process of sugars: sucrose crystallisation was inhibited by starch (Roos and Karel, 1991) and by corn syrup polymers (Gabarra and Hartel, 1998) and trehalose crystallisation was delayed by polymers, salts, biopolymers and other sugars (Santagapita and Buera, 2008, Santagapita *et al*., 2008, Miao and Roos, 2005). The presence of proteins caused a delay of lactose crystallisation in comparison with pure

lactose systems in skim milk powder (Jouppila and Roos, 1994; Senoussi *et al*., 1995) and modified-whey powders (Burin *et al*. 2004).
Biopolymers (like guar and locust bean gums) are often used as emulsifiers, thickening and stabilizing agents (Roman-Guerrero *et al*. 2009, Beristain *et al.* 2001). The seeds of the *vinal* tree (*Prosopis ruscifolia*) have an interesting galactomannan gum of similar structure of guar gum (Busch *et al*., 2011) and can be used as local product to substitute the latter, avoiding the necessity of its importation and allowing to improve local production and overall economy.
The aim of this work was to analyze the effect of *vinal* gum (VG) obtained from *Prosopis ruscifolia* on the crystallisation kinetics of lactose or trehalose in freeze-dried systems subjected to humidification to their critical relative humidity (RH). A comparison of a similar and commercially available gum (guar gum) was conducted.

MATERIALS AND METHODS

Separation of seeds and extraction of vinal (Prosopis ruscifolia) gum

Vinal pods were collected in province of Formosa, Argentina, in 2010. The separation of the seeds from the pods was performed in a rice mill and then passing the product through sieves (Sonytest) of 3360 and 1410 μm (where seeds are retained).
The VG extraction was done by a basic treatment of the seeds (Chaires Martinez *et al.* 2008) and by flocculation in ethanol. Briefly, 20 g of seeds were treated at 25°C in 200 mL of 1 M NaOH for 24 h with stirring. Subsequently, the different fractions were manually separated: tegument (dark skin), endosperm (having the consistency of a gel after NaOH treatment) and germ. The VG was extracted from the endosperm obtained by placing it in 100 mL of distilled water under stirring for 24 h., then was centrifuged for 3 min at 4500 rpm and the supernatant solution was poured into 200 mL of absolute ethanol (Biopack). Flocculation of the polymer occurred during the storage in the refrigerator (8ºC) for 3 h. Purification was done by solubilization in 50 mL of bidistilled water and another precipitation in ethanol. The obtained VG was dried in a vacuum oven at 25°C (300 mbar).

Preparation of freeze-dried systems

Amorphous samples were prepared by freeze-drying. Aqueous solutions 20% (w/v) of lactose (Anedra) or trehalose (Hayashibara) with or without 0.1 or 0.5% (w/v) of the polymers GG (Cordis) or VG. Aliquots of 2 mL of each system were placed in 5-mL vials, frozen at -26ºC and immersed in liquid nitrogen (-196ºC) before freeze-drying.
A freeze drier (ALPHA 1-4 LD2 Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Germany) was operated at −55 °C, at a chamber pressure of 0.04 mbar. The freeze-drying process lasted 48 h. The main drying was performed without shelf temperature control and the secondary drying was performed at 25 °C.
After freeze drying, trehalose systems were exposed for 1 day over a saturated salt solution of K_2CO_3 (43% RH) at 25°C in an open aluminum pan for DSC (Greenspan, 1977).
Lactose systems were exposed for 15 days over a saturated salt ($MgCl_2$) solution at 33% RH (25ºC).

Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC was used to determine glass transition temperature (T_g), both sugar crystallisation (exothermic peak) and melting (endothermic peak) temperatures and enthalpies, onset and endset times of crystallisation. A Mettler Toledo 822 DSC (Mettler Toledo AG, Switzerland) with STARe Thermal Analysis System version 3.1 software (Mettler Toledo AG) was used for all the measurements. The melting of crystalline trehalose present in a sample was observed as an endothermic peak at around 97°C (Santagapita and Buera, 2008). The instrument was calibrated using standard compounds of defined melting point (cyclopentane and indium) and heat of melting (indium). All measurements were made with 5-10 mg sample mass, using hermetically sealed aluminium pans of 40 μL inner volume (Mettler); an empty pan was used as a reference. DSC dynamic curves were obtained by heating samples from 0 to 130 °C with a heating rate of 10 °C min^{-1}. The confidence intervals estimated for temperature and enthalpy values were 2 °C and 10 mJ, respectively.
In systems containing trehalose, the degree of trehalose dihydrate crystallisation (ϕ) was calculated from the ratio of the area of the endothermic melting peak in the sample thermogram (ΔH_m) and the melting enthalpy of pure trehalose dihydrate (ΔH_{mT}, 139 J g^{-1}) measured by DSC in the same conditions, as shown in Equation 1.

$$\phi = \frac{(\Delta H)_m}{(\Delta H)_{m_T}} * 100 \quad (1)$$

Also, in order to analyse de crystallisation during humidification and before the DSC run, the degree of trehalose crystallisation during humidification (ϕ_h) was studied. ϕ_h was calculated from the ratio of the difference of areas of the endothermic melting peak (ΔH_m) and the exothermic crystallisation peak (ΔH_c), and the melting enthalpy of pure trehalose dehydrate, as shown in Equation 2.

$$\phi_h = \frac{[(\Delta H)_m - (\Delta H)_c]}{(\Delta H)_{m_T}} * 100 \quad (2)$$

Moisture content determination

The moisture contents of the equilibrated samples were determined by difference in weight before and after drying in vacuum oven at 80°C and 300 mbar for 48 h. This condition had been proved to be adequate to assess constant weight in each case.

Crystallisation kinetics: the Avrami equation

In order to evaluate lactose crystallisation, isothermal DSC runs, at lactose with and without gums systems, at 50, 55, 60 and 65ºC and during 130 minutes were done. Crystallisation time was defined as the time when ends crystallisation (endset of exothermic peak) minus the induction time (onset time of the same peak).

From the isothermal DSC runs sugar crystallisation kinetic was calculated by integrating the exothermal peak with respect to time to determine the area related to heat of crystallisation and thus the crystalline fraction (α). α was plotted against time and analysed using the Avrami equation (Avrami *et al.* 1939):

$$1 - \alpha = \exp(-Kt^n) \quad (3)$$

Where α represents the fraction of the sugar crystallized at time t (α=1 corresponds to the total peak area); K is the rate constant of isothermal crystallisation [(time)^{-}n] which depends primarily on the crystallisation temperature, and n is known as the Avrami index, a parameter characteristic of nucleation and growth mechanisms of the crystals. The Avrami equation is particularly valuable because it provides important information about the crystallisation mechanisms when crystals form from a relatively pure melt (Arvanitoyanis and Blanshard 1994)

In the present work, the Avrami model was used as a tool for the kinetic analysis. Time t was taken as the time of the experiment minus the induction time. The induction time normally corresponds to the time until a stable crystal nucleus starts to grow.

RESULTS AND DISCUSSION

Freeze-dried trehalose formulations humidified at 43% RH

The dynamic thermograms of trehalose systems equilibrated at 43% RH are shown in Figure 1. The T_g values were similar for all three systems (onset temperatures between 15°C and 17°C) showing that the addition of gums did not affect T_g (which is 18°C at 43% RH, according to Mazzobre and Buera, 1999). T_g values are lower than humidification temperature and the water content of the samples (higher than 10%) was enough to form trehalose dihydrate crystals, which are the main crystalline form of trehalose. Thus, at 25°C the systems were at the super-cooled state and crystallisation could occur during humidification. Enthalpies values of crystallisation were smaller than the melting ones for all systems. As a result, trehalose crystallized during storage at 43% RH, before the DSC run. The highest value of melting enthalpy was obtained for trehalose system and the smallest one for trehalose-VG.

Table 1 shows the degrees of total trehalose crystallisation (ϕ) and of trehalose crystallisation during humidification (ϕ_h). Both highest ϕ_h and ϕ were obtained for trehalose system (without gum). VG system

showed the lowest ϕ_h as well as the lowest ϕ. GG-trehalose system had intermediate values. These results show that the inhibition of trehalose crystallisation was achieved by both gums and especially by VG.

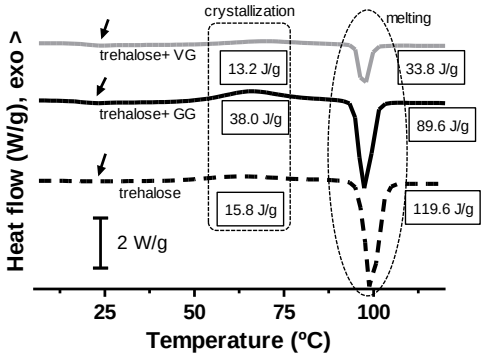


Figure 1: DSC thermograms of freeze dried trehalose systems with 0.1% w/v guar or *vinal* gums 0.1% (GG and VG, respectively) or without gums equilibrated in DSC pans at 43 % RH for one day. Arrows show glass transition (T_g) and crystallisation and melting enthalpies values are indicated.

Table 1: Degree of total trehalose dihydrate crystallisation (ϕ) and degree of trehalose dihydrate crystallisation during humidification (ϕ_h) of freeze dried trehalose systems with 0.1% w/v guar or *vinal* gums (GG and VG, respectively) or without gums equilibrated in DSC pans at 43 % RH for one day.

	ϕ	ϕ_h
trehalose	86.1	74.7
trehalose + GG	64.5	37.1
trehalose + VG	24.3	14.9

Freeze-dried lactose formulations humidified at 33% RH

Lactose samples (with or without gums) equilibrated at 33% HR have a T_g value around 40°C. Lactose crystallizes as monohydrate but the crystallisation of the anhydrous form is also possible. In both cases, the water content of the systems at 33% RH allows lactose crystallisation when the temperature exceeds the T_g. Then, isothermal DSC runs were conducted at several temperatures between 50 and 65°C in order to evaluate lactose crystallisation. As an example of the obtained thermograms, Figure 2 shows those obtained at 55°C. Earlier and sharper peaks related to lactose crystallisation appeared in lactose-gum termograms. GG-lactose system showed the earliest and smaller exothermic peak. The VG-lactose system presented a peak at intermediate times between lactose and GG-lactose systems. The shape of the peak and the crystallisation enthalpy for the systems containing VG and GG were similar between them. Instead, lactose system without gum had wider peak of crystallisation for all the temperatures studied. This difference in shape for the crystallisation peak could be related to a variation of the lactose crystallisation mechanism as a consequence of the gum presence (Kedward et al, 1998). The same trend was obtained at 60 and 65°C for the three systems (data not shown) respect to the thermograms showed in Figure 2. At 50°C, only the GG- lactose system showed crystallisation during 130 minutes-DSC runs.

Figure 3a shows the crystallisation enthalpy as a function of temperature for all studied systems. Lactose system showed the highest crystallisation enthalpies, which increased for higher temperatures. Both gum-lactose systems had lower enthalpy values than lactose systems, with similar values between them, which also remained steady when temperature was increased. The fact that the gum free system presented the highest crystallisation enthalpy showed that lactose crystallisation thermodynamics is affected in the presence of both gums.

Fig 3b shows the crystallisation time (the time difference between endset and onset crystallisation, or induction time). The gum-free system showed the slowest lactose crystallisation rate at all analysed temperatures. VG and GG systems showed shorter and similar crystallisation times, which decreased slightly as increasing temperature of the isothermal run at DSC.

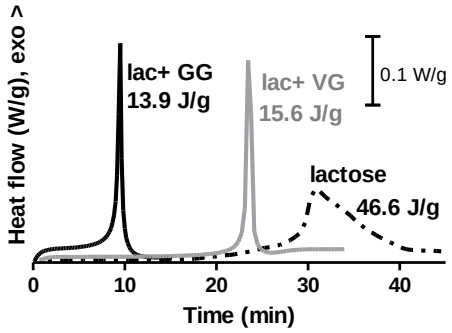


Figure 2: isothermal DSC thermograms of lactose and lactose with 0.5% *vinal* gum (VG) or guar gum (GG) equilibrated at 33% HR for 15 days. Crystallisation enthalpies values are indicated.

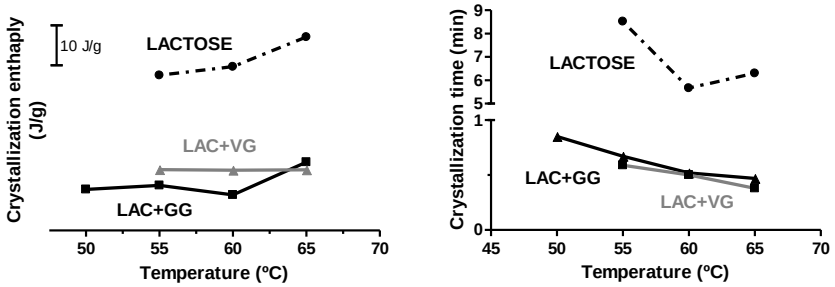


Figure 3: Isothermal DSC crystallisation enthalpies (a) and times (b) of lactose and lactose with *vinal* gum (VG) or guar gum (GG) 0.5% as a function of temperature. Crystallisation time is the time when ends the crystallisation minus the induction time.

In order to deeply understand the crystallisation results, the kinetic of crystallisation was analysed by using Avrami equation (Mazzobre *et al.* 2001). When applied for use with DSC, it is assumed that the differential area under the crystallisation curve with time corresponds to the dynamic changes in the conversion of mass from the amorphous phase to the solid phase. Fig 4 shows the Avrami equation fit for lactose crystallisation at 55, 60 and 65ºC in a VG-lactose system. The lactose and GG-lactose systems (data not shown) had similar shapes and trends. (all fits had R^2 higher than 0.98). The curves showed a shift to lower times of crystallisation as increasing temperature. The *k* value from the Avrami equation is related to the rate of crystallisation. Table 2 shows *k* and *n* values for the three systems at different temperatures of crystallisation. Lactose crystallisation rate is lower in lactose system (with smaller *k* values) than at gum-lactose ones. *k* value increased with temperature for all systems analysed, as expected from the results of times of crystallisation. These increments in crystallisation rate when increasing temperature has been reported by several authors and has been modelled using Williams-Landel-Ferry model. (Mazzobre *et al.* 2001, Das and Langrish 2012). These results of *k* confirmed the results seen in Figure 3b of crystallisation times, the lactose crystallisation is faster and its kinetic is in certain way modify in a polymer environment.

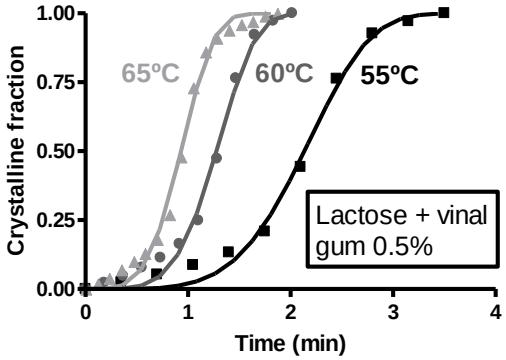


Figure 4: Avrami equation (lines) of isothermal crystallisation of lactose in the lactose system with *vinal* gum 0.5%. Symbols show experimental DSC values.

Table 2: Values of *k* and *n* from Avrami equation for isothermal crystallisation of lactose, and lactose with *vinal* gum (VG) or guar gum (GG) 0.5% as a function of temperature.

	Lactose		**Lactose + GG**		**Lactose + VG**	
T (°C)	*N*	*k*	*n*	*k*	*n*	*k*
50			3.4 ±0.2	0.028		
55	3.7 ±0.1	$2.4*10^{-5}$		0.867	4.7 ±0.4	0.019
60	3.5 ±0.1	$1.9*10^{-4}$	3.7 ±0.5	1.361	4.7 ±0.4	0.217
65	3.0 ±0.1	$6.2*10^{-4}$	2.7 ±0.2	0.559	4.2 ±0.3	0.931

Lactose and lactose with GG systems presented *n* values close to 3 (between 2.6 and 3.7). An *n* value of 3 indicates spherulitic growth from sporadic nuclei (Christian, 1975). VG- Lactose system showed a higher *n* value (between 4.2 and 4.7) for all temperatures analysed. This increase in *n* value could be attributed to geometric factors associated to the modification of molecular environment that facilitate nucleation. *n* value was found to decrease by increasing temperature for all the systems. This trend in *n* value by increasing temperature had already been reported by Kedward *et al*. (1998) and may indicate a different crystallisation mechanism at higher temperature. The results obtained for *n* and *k* to lactose system were similar to those reported by Mazzobre *et al*. (2001).

It is important to consider both thermodynamic and kinetic aspects regarding lactose crystallisation in presence of gums. Gums appeared to accelerate the kinetics by decreasing the time and increasing the rate of lactose crystallisation but on the other hand the amount of lactose crystals (evaluated from the crystallisation enthalpy values) is much lower in the presence of polymers or they were more imperfect.

CONCLUSIONS

The study of lactose crystallisation in presence of gums allowed separating thermodynamical and kinetic aspects.

Trehalose and lactose crystallisation occurred at a lower degree in presence of both guar and *vinal* gums, considering the enthalpies of crystallisation peaks obtained by DSC.

On the other hand, the Avrami equation analysis showed a slower rate of crystallisation for the lactose system, in comparison with the gum containing systems. The higher *n* value for VG- lactose system indicates a different mechanism of crystallisation that could be related to geometric, thermodynamic or kinetics factors.

The presence of gums promoted a faster lactose crystallisation, with more imperfect crystals formation, but the degree of crystallisation occurred at a lower extent, especially in vinal gum systems. Besides the academic consequences of the analysed phenomena, the studied gum obtained from local sources demonstrated potential application as a sugar crystallisation-modifier agent.

REFERENCES

Arvanitoyanis I, Blanshard J. 1994. Rates of crystallisation of dried lactose-sucrose mixtures. Journal of Food Science, 59(1): 197-205

Avrami M. 1939. Journal of Chemical physics, 7:1103–1112

Beristain CI, Garcmha HS, Vernon-Carter EJ. 2001. Spray-dried encapsulation of cardamom (*Elettaria cardamomum*) essential oil with mesquite (*Prosopis juliflora*) gum. LWT, 34:398-401.

Buera MP, Schebor C, Elizalde B. 2005. Effects of carbohydrate crystallisation on stability of dehydrated foods and ingredient formulations. Journal of Food Engineering, 67:157–165

Senoussi A, Dumoulin ED, Berk Z. 1995. Retention of diacetyl in milk during spray-drying and storage. Journal of Food Science, 60: 894–897

Burin L, Jouppila K, Roos Y, Kansikas J, Buera MP. 2004. Retention of b-galactosidase activity as related to Maillard reaction, lactose crystallisation, collapse and glass transition in low moisture whey systems. International Dairy Journal, 14: 517–525

Busch VM, Santagapita PR, Buera MP. 2011. Aplicaciones de la calorimetría para caracterizar las transiciones térmicas de semillas de vinal (*Prosopis ruscifolia*) y sus potenciales aplicaciones tecnológicas,. XIII Congreso Argentino CYTAL ISBN 978-987-22165-4-2

Chaires-Martínez L, Salazar-Montoya JA, Ramos-Ramírez EG. 2008. Physicochemical and functional characterization of the galactomannan obtained from mesquite seeds (*Prosopis pallida*). The Journal European Food Research and Technology, 227: 1669 –1676

Das D, Langrish TAG. 2012. Activated-rate theory: Effect of protein inhibition and the temperature dependence of crystallisation kinetics for lactose-protein mixtures. Food Research International, 48: 367-373

Gabarra P, Hartel W. 1998. Corn syrup solids and their saccharide fractions affect crystallisation of amorphous sucrose. Journal of Food Science, 63: 523-528.

Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. Journal of Research of the National Bureau of Standards — Section A Physics and Chemistry, 81A, 89–96.

Haque MK, Roos YH. 2006. Differences in the physical state and thermal behavior of spray-dried and freeze-dried lactose and lactose/protein mixtures. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 7:62- 73

Kedward CJ, Macnaughtan W, Blanshard JMV, Mitchell JR. 1998. Crystallisation kinetics of lactose and sucrose based on isothermal differential scanning calorimetry. Journal of Food Science, 63(2): 192-197

Christian JW. 1975. The theory of transformations in metals and alloys (2nd ed). London: Pergamon Press.

Jouppila K, Roos YH. 1994. Glass transitions and crystallisation in milk powders. Journal of Dairy Science, 77: 2907–2915

Mazzobre MF, Soto G, Aguilera JM, Buera MP. 2001. Crystallisation kinetics of lactose in systems co-lyofilized with trehalose. Analysis by differential scanning calorimetry. Food Research International, 34: 903-911

Mazzobre MF, Buera MP. 1999. Combined effects of trehalose and cations on the thermal resistance of β-galactosidase in freeze-dried systems. Biochimica et Biophysica Acta, 1473: 337–344

Mazzobre MF, Buera MP, Chirife J. 1997. Protective role of trehalose on thermal stability of lactase in relation to its glass and crystal forming properties and effect of delaying crystallisation. LWT, 30:324–329

Miao S, Roos YH. Crystallisation kinetics and X-ray diffraction of crystals formed in amorphous lactose, trehalose, and lactose/trehalose mixtures. Journal of Food Science, 70(5): 350-358

Richards AB, Krakowkab S, Dexterc LB, Schmidd H, Wolterbeeke APM, Waalkens-Berendsene DH, Shigoyukif A, Kurimotof M. 2002. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. Food and Chemical Toxicology, 40:871–898

Roman-Guerrero A, Orozco-Villafuerte J, Perez-Orozco JP, Cruz-Sosa F, Jimenez-Alvarado R, Vernon-Carter EJ. 2009. Application and evaluation of mesquite gum and its fractions as interfacial film formers and emulsifiers of orange peel-oil, Food Hydrocolloids, 23: 708–713

Roos Y, Karel M. 1991. Phase transitions of amorphous polysaccharides and sugars, Biotechnology Progress, 7: 49-53

Santagapita, P. R.; Buera, M. P. Electrolyte effects on amorphous and supercooled sugar systems J. Non-Cryst. Solids 2008, 354, 1760–1767.

Santagapita, P. R., Gómez Brizuela, L., Mazzobre, M. F., Ramirez, H., Corti, H. R., Villalonga Santana, R., and Buera, M. P. (2008). Structure/function relationships of several biopolymers as related to invertase stability in dehydrated systems. Biomacromolecules, 9, 741–747.
Williams ML, Landel RF, Ferry JD. 1955. The temperature dependence of relaxation mechanisms in amorphous polymers and other glass-forming liquids. Journal of the American Chemical Society, 77: 3701-3707

ACKNOWLEDGMENTS
The authors acknowledge CONICET (PIP 100846), ANPYCT (PICT 0928) and UBA (2002100100397) for financial support.

Derivados de hesperidina como antioxidantes para grasas empleadas en alimentos

Céliz G.[1,2], Campos F.[1] y Daz M. [1,2]

1: Universidad Nacional de Salta (UNSa), Salta, Argentina.
2: Instituto de Investigaciones para la Industria Química (INIQUI), Salta, Argentina.
gceliz@unsa.edu.ar

Resumen: Los antioxidantes tradicionales en alimentos (TBHQ, BHT y BHA) son potenciales carcinogénicos en humanos. Con el fin de proponer antioxidantes alternativos, **se** investigó la actividad antirradicalaria y la capacidad de retardar la autoxidación lipídica de grasa de dos flavonoides: glucósido de hesperetina (GH) y laurato de glucósido de hesperetina (LGH). La actividad antirradicalaria se ensayó por el método del DPPH y la capacidad de retardar la autooxidación se evaluó mediante Índice de Peróxidos. Ambos compuestos tuvieron actividades antirradicalarias comparables aunque menores que las de BHT y BHA. En cuanto a la autooxidación de grasas, se determinó que las muestras de grasa adicionadas con GH (140 ppm) o LGH (200 ppm) alcanzaron 10 meq/kg (máximo permitido por el Código Alimentario Argentino) luego de 220 días de incubación a 50 ºC, lo cual representa una mejora del 900 % respecto a las muestras de grasa sin aditivos. Puede concluirse que ambos derivados son aptos como antioxidantes para matrices grasas. LGH, además, es soluble en matrices grasas y se presume que tendrá actividad antibacteriana, lo que le permitirá conservar alimentos tanto de la oxidación como de las contaminaciones bacterianas más frecuentes.

Palabras claves: Flavonoides cítricos, ésteres alquílicos de flavonoides cítricos, antioxidantes, aditivos.

Abstract: Common food antioxidants (TBHQ, BHT and BHA) are potential human carcinogens. In order to propose alternative food antioxidants, it was investigated the antiradical activity and ability to retard lipid peroxidation of hesperetin glucoside (GH) and its lauroyl ester (LGH). Antiradical activity was tested by the DPPH method and Peroxide Value was used to evaluate the ability to retard the autoxidation of fat. Results showed that both compounds have similar activities as radical scavengers and that these values were lower than those determined for BHT and BHA. With regard to autoxidation of fats, it was determined that the samples with GH (140 ppm) or LGH (200 ppm) reached 10 meq/kg after 220 days of incubation at 50 °C, which represented a 900 % improvement over the control. It was concluded that both derivatives can be used as antioxidants in fatty matrixes. LGH also is fat-soluble and is presumed that it has antibacterial activity, wich it would allow to preserve foods against both the lipid peroxidation and the food contaminations by bacterias.

Key words: *Citrus* flavonoids, alkyl esters of *Citrus* flavonoids, antioxidants, food preservatives.

INTRODUCCIÓN

Los flavonoides protegen a los organismos del daño causado por agentes ambientales como los rayos UV, la polución ambiental y diversos químicos exógenos. Actúan en plantas como antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores, repelentes de insectos, atrayentes de polinizadores o presas, entre otras funciones (Iwashina, 2003). Poseen un esqueleto del tipo difenilpirano (C6-C3-C6): dos anillos de fenilos (A y B) unidos a través de un anillo heterocíclico (C), de tres carbonos (Figura 1). Las subclases de flavonoides más frecuentes en frutas cítricas son flavanonas y están presentes en las formas de glicósidos o de agliconas (Horowitz y Gentili, 1977). Las formas glicosídicas más frecuentes son: rutinósidos y neohesperidósidos. Las flavanonas naringina y neohesperidina poseen el azúcar neohesperidosa (ramnosil-α-1,2 glucosa). A partir de estos flavonoides es posible obtener ramnosa por hidrólisis enzimática. Este carbohidrato es de gran interés en la industria cosmética ya que se utiliza en diversas formulaciones (Vichy Laboratoires, 2012). La potencial producción de ramnosa a partir de neohesperidina daría como subproducto el glucósido de hesperetina (GH). El aprovechamiento de este glucósido mejoraría el balance económico de la reacción. Más aún, el estudio de las propiedades del glucósido, como así también de las sustancias que puedan derivarse a partir de éste, puede convertirlo de subproducto al producto de la hidrólisis con mayor interés económico. En este sentido es interesante mencionar que existen publicaciones recientes que indican que la biodisponibilidad de hesperidina en humanos se incrementa por la conversión del diglicósido a GH (Nielsen y cols., 2006).

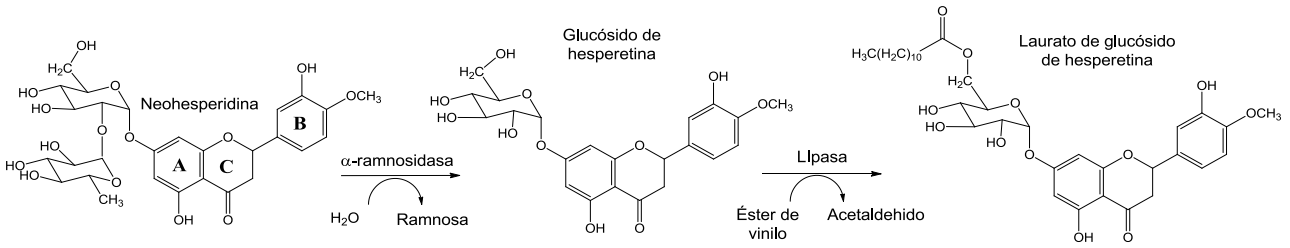


Figura 1. Obtención de ramnosa, glucósido de hesperetina y su éster de laurato a partir de neohesperidina mediante catálisis enzimática.

Por otra parte se ha determinado que los flavonoides cítricos poseen acción antirradicalaria (Bors y cols., 1990; Cook y Samman, 1996) la cual es atribuida a que pueden donar hidrógenos. De hecho, los grupos fenólicos (principalmente los del anillo B) sirven como una fuente de átomos de hidrógeno de fácil acceso y el radical que resulta de la entrega de hidrógeno puede estabilizarse deslocalizando la carga.

A pesar de que existen varios métodos para medir la actividad antirradicalaria (Prior y cols., 2005), el método que emplea 1,1-difenil-2-pricrilhidrazil (DPPH), es el más usado para cuantificar la capacidad de una molécula de capturar radicales libres. La molécula DPPH (Figura 2) es un radical libre estable que deslocaliza el electrón desapareado que posee en toda su estructura, de modo tal que las moléculas no pueden formar dímeros, como sucede con la mayoría de los radicales libres (Molyneux, 2004). Esta deslocalización también es la responsable del intenso color violeta del sólido y se caracteriza por una banda de absorción centrada alrededor de 520 nm.

Cuando una solución de DPPH (DPPH*) se mezcla con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, la molécula reacciona sustrayendo un hidrógeno atómico y genera una molécula de DPPH reducida (DPPH-H) con la consecuente pérdida de color (en realidad las soluciones de DPPH reducidas tienen color amarillo pálido que se debe al grupo picrilo todavía presente). Si representamos la molécula del agente antirradicalario como AH, la reacción es:

$$DPPH^* + AH = DPPH\text{-}H + A^*$$

Donde A* es otro radical que, dependiendo de qué molécula se trate, puede donar otro hidrógeno a otra molécula de DPPH* generando una molécula más oxidada y estable. Este es el caso, por ejemplo, de la vitamina C. Los radicales A* deben ser lo suficientemente estables como para mantenerse inertes y no propagar reacciones radicalarias.

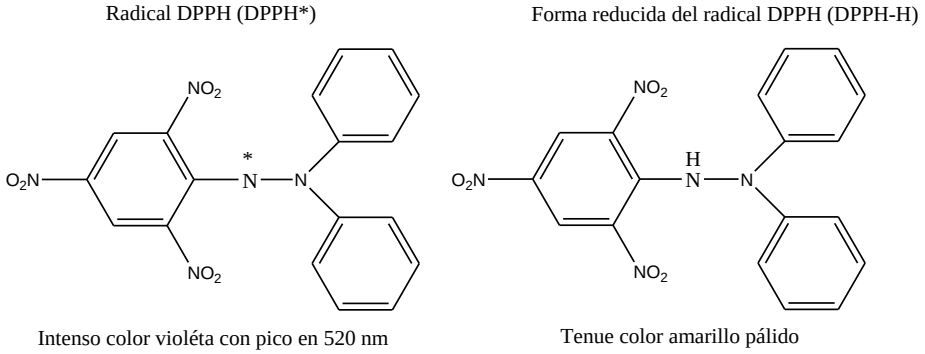


Figura 2. Formas oxidadas y reducidas del radical 1,1-difenil-2-pricrilhidrazil (DPPH).

El aprovechamiento de la propiedad antirradicalaria de los flavonoides está severamente restringido por la baja solubilidad que presentan en matrices lipídicas. Para superar esta limitación muchos autores han estudiado la modificación estructural de flavonoides para aumentarles sus solubilidades en matrices lipofílicas . Se ha observado que es conveniente realizar transformaciones por vías enzimáticas debido al elevado grado de regioselectividad (Figura 1), las condiciones suaves de las reacciones así como los altos rendimientos logrados (Chebil y cols., 2007).

Los antioxidantes, tanto sintéticos como naturales, se emplean en aceites y grasas para prevenir el avance de la oxidación lipídica, la cual produce compuestos que otorgan a la matriz donde se encuentran colores, olores

y/o sabores no deseables. En general la oxidación de los lípidos en los alimentos se debe a la reacción del oxígeno con los lípidos insaturados. La oxidación lipídica de ácidos grasos insaturados consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación. Las reacciones de iniciación más importantes involucran la sustracción de un hidrógeno atómico de un carbono vecino a un doble enlace (hidrógeno α) por parte de radicales hidroxilo (HO●) o hidroperóxido (HOO●). Luego, la etapa de propagación involucra el ataque del radical centrado en carbono con oxígeno para formar un radical peroxilipídico, el cual puede sustraer un hidrógeno α de otro ácido graso para formar un hidroperóxido y otro radical lipídico que continuará la reacción en cadena (Figura 3 A). En la fase de terminación, los radicales pueden combinarse entre sí y los peróxidos pueden consumirse en numerosas y complicadas reacciones secundarias cuyos productos son los responsables de alterar las propiedades organolépticas de las grasas. Un antioxidante efectivo debe interrumpir la reacción en cadena capturando el radical iniciador, el lípido radical o el lípido peroxilradical.
Una forma de seguir las reacciones de autoxidación es a través del Índice de Peróxidos que es una determinación volumétrica de los grupos peróxidos e hidroperóxidos (Figura 3B).

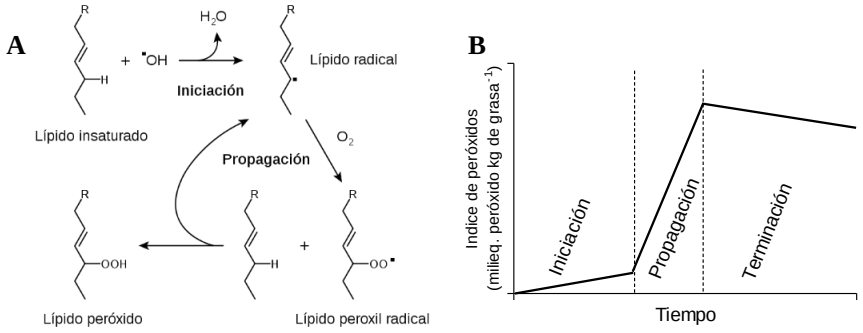


Figura 3. A) Esquema de las reacciones de iniciación y propagación sobre ácidos grasos insaturados
B) Variación del Índice de Peróxidos en las distintas etapas de la autooxidación lipídica.

Los antioxidantes más empleados en alimentos (TBHQ, BHT y BHA) son sintéticos y el empleo de los mismos presenta controversias porque son aceptados por la FDA a pesar de ser potenciales agentes carcinogénicos de humanos (Health and Human Services Secretary, 2011).
Con el fin de proponer aditivos antioxidantes alternativos, en este trabajo se investigaron las capacidades de capturar radicales libres y de retardar la autoxidación de grasa bovina de dos derivados de neohesperidina: glucósido de hesperetina (GH), que se obtiene por hidrólisis de hesperidina o neohesperidina catalizada por α-ramnosidasa de *Aspergillus niger*; y de laurato de glucósido de hesperetina (LGH), que resulta de esterificar GH con laurato de vinilo empleando lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym 435) en acetona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de neohesperidina

El flavonoide neohesperidina fue obtenido previamente en la Facultad de Ciencias Exactas de la UNSa a partir de naranjas variedad *Citrus aurantium* de la región Noroeste de Argentina. El proceso de extracción consistió en triturar frutos de entre 1 y 3 cm de diámetro y luego someterlos a extracción con etanol:agua 25:50 (v/v) a 25 ºC. El extracto se enfrió, lo que produjo la precipitación de los flavonoides. El sólido, filtrado y lavado, se secó en estufa a 50 ºC (Macoritto y cols., 2004). Una etapa posterior de purificación consistió en recristalizar en agua y en etanol absoluto. La neohesperidina obtenida tuvo una pureza superior al 99% determinada por HPLC por comparación con un estándar de Extrasynthese (Francia).

Obtención de glucósido de hesperetina

GH se obtuvo por hidrólisis enzimática a partir de neohesperidina empleando una α-L-ramnosidasa comercial de *Aspergillus niger* de Amano (Japón) (Ellenrieder y cols., 1998) en solución reguladora acetato de sodio 20 mM pH 5 a 50 °C siendo los productos de la hidrólisis ramnosa (25 g/l) y GH, el cual fue purificado por sucesivas precipitaciones en frío y se obtuvo con una pureza superior al 99% medida por HPLC.

Síntesis de laurato de glucósido de hesperetina

LGH se sintetizó en base a investigaciones previas (Céliz y Daz, 2011), empleando GH y laurato de vinilo. Como solventes se empleó acetona y la reacción fue catalizada por el derivado inmovilizado de lipasa B de *Candida antárctica,* Novozym 435, donado por Novozymes Latin America Limited (Brasil).

Estudio del poder antirradicalario

El método del DPPH para determinar actividad antirradicalaria consiste en emplear una solución metanólica de DPPH de concentración conocida a la cual se le agrega el antioxidante disuelto en metanol. Luego se registra la disminución de la absorbancia con el tiempo a 520 nm. Las variaciones posibles en la técnica y las formas de informar los resultados son muchas y no existe aún consenso en este sentido (Prior y cols., 2005), por ende suele ser difícil contrastar resultados de diferentes autores. En este trabajo se siguió la metodología descripta por Brand-Williams y cols. (1995).

Curva de Calibración de DPPH: Se preparó una disolución patrón de DPPH (Sigma, Estados Unidos) próxima a 1 10^{-4} mol L^{-1} en metanol (Sintorgan, Argentina). Luego, se determinó la longitud de onda de máxima absorbancia del DPPH (518 nm) en un espectrofotómetro GBC Cintra 101 (GBC, Australia). A partir de esta solución, se preparan diluciones 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 y 1/6 (v/v) que se emplearon para construir una curva de calibrado. Como blanco se utilizó metanol puro.

Determinación del poder antirradicalario: Se preparó una solución de DPPH aproximadamente 6,0 10^{-5} M a la cual se le determinó la concentración exacta empleando la curva de calibración. Para la reacción se colocaron en tubos plásticos con tapas, 50 µL de cada solución del antioxidante de interés en metanol y 950 µL de la solución stock de DPPH. Los tubos se conservaron tapados en la oscuridad y a 4 ºC. Como blanco se utilizó un tubo conteniendo 50 µL de metanol y 950 µL de la solución de DPPH. Se siguió la concentración de DPPH remanente en función del tiempo y se transformó en porcentaje según:

$$DPPH(\%) = \frac{[DPPH]_t}{[DPPH]_0} * 100 \quad (1)$$

Donde $[DPPH]_t$ es la concentración de DPPH a un determinado tiempo y $[DPPH]_0$ es la inicial. De éstos gráficos, se determinó el porcentaje de DPPH remanente cuando la variación de la absorbancia con el tiempo fue prácticamente constante (estado estacionario) y estos valores fueron transferidos a otra gráfica que muestra el porcentaje de DPPH remanente en el estado estacionario como una función de la relación molar antioxidante/DPPH. La actividad antirradicalaria fue definida por Brand-Williams y cols. como la cantidad de antioxidante por mol de DPPH necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50 % en el estado estacionario (EC50).

Efecto protector de GH y LGH frente a la peroxidación lipídica de grasa bovina

Debido a que los aceites del reino vegetal contienen naturalmente grandes cantidades de antioxidantes, se eligió trabajar empleando grasa bovina cuya composición promedio es 25 % de ácido palmítico (C16:0), 15 % de ácido esteárico (C18:0) y 47 % de ácido oleico (C18:1) y naturalmente no posee ningún antioxidante (Grompone, 1991). La grasa empleada se obtuvo de tejidos grasos frescos de vacas para consumo.

Los tejidos grasos se fundieron en balón cerrado a temperaturas no mayores a 100 ºC. Luego se descartó el tejido sólido en caliente y la grasa fundida se purificó precipitando proteínas con sal (NaCl), filtrando y eliminando la sal mediante lavados con agua. Finalmente la grasa se secó con cloruro de calcio.

La grasa fundida se enriqueció con GH y LGH a una concentración 0,3 mM, disolviendo previamente los compuestos en etanol. Luego, se distribuyó en porciones de 4-5 g. La grasa sin aditivos (control) y las enriquecidas se colocaron en estufa a 50 ºC con circulación forzada de aire.

Entre las exigencias que las grasas deben cumplir en el C.A.A. está fijado un valor máximo de Índice de Peróxidos de 10 meq kg^{-1} (Artículos 540 y 543). Por este motivo se cuantificó el avance de la oxidación determinando el Índice de Peróxidos hasta que se superó el valor permitido.

Técnica para la determinación del Índice de Peróxidos: Se siguió la metodología analítica oficial del C.A.A. (Horwitz, 2005). La técnica del Índice de Peróxidos es una determinación volumétrica de los grupos peróxidos e hidroperóxidos. La cuantificación se basa en la reacción de yoduro de potasio con los peróxidos de la muestra para liberar yodo, el cual es titulado con tiosulfato de sodio, empleando almidón como indicador (Nielsen, 1998).

Cada determinación consistió en pesar la masa de cada poción de grasa en un erlenmeyer de 250 ml, agregar 25 ml de solución ácido acético-cloroformo (3:2, v/v) y agitar hasta comprobar la disolución total de la grasa.

Luego se agregaron 0,5 ml de solución saturada de KI, se agitó vigorosamente 10 segundos, se mantuvo el sistema en reposo en la oscuridad durante 1 minuto y se añadieron 75 ml de agua destilada hervida y fría. Acto seguido, se tituló con $Na_2S_2O_3$ 0,01 N hasta que se obtuvo un color amarillo pálido. En este punto se adicionaron 0,5 ml de solución indicadora de almidón (1 % en agua) y se continuó la titulación hasta la desaparición del color azul. El Índice de Peróxidos se obtuvo calculando los miliequivalentes de tiosulfato utilizados en la titulación por kg de muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antirradicalaria de GH y LGH

La Figura 4 B presenta la curva de calibrado obtenida, con la cual se transformaron absorbancias en concentraciones. La Figura 4 B muestra, como ejemplo, los perfiles cinéticos de la reacción del DPPH con dos compuestos, a una relación molar antioxidante/DPPH de 10. De esta gráfica puede verse que el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario está próximo a las 6 h.

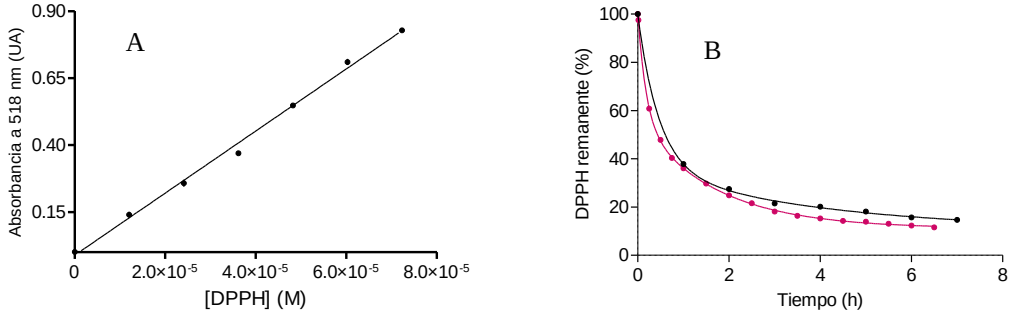


Figura 4. A) Curva de calibración obtenida de DPPH por espectrofotometría a 520 nm, B) Perfil de reacción de DPPH (6.5 10^{-5} M) con GH (negro) y LGH (bordó). Relación molar antioxidante/DPPH 10.

La Figura 5 muestra los porcentajes de DPPH remanentes en el estado estacionario a diferentes relaciones molares iniciales para todos los compuestos ensayados.

El valor de EC50 determinado para GH y LGH (1.6±0.2 mol de antioxidante/mol de DPPH), pone en evidencia que si bien el valor es interesante, la capacidad antirradicalaria es menor a la de BHT o BHA (0.24±0.02 mol de antioxidante/mol de DPPH). La Figura 5 también muestra claramente que no existen diferencias importantes en el poder antirradicalario frente a DPPH entre ambos compuestos. Este resultado contradice los obtenidos por Salem y cols. (2010), quienes afirmaron que la actividad antirradicalaria frente a DPPH disminuyó a medida que se incrementó la longitud de la cadena de ésteres alquílicos de isoquercitrina. Sin embargo, están de acuerdo con otras investigaciones en las que se concluyó que la actividad antirradicalaria es independiente de la acilación (Figueroa-Espinoza y Villeneuve, 2005; Viskupicova y cols., 2010) ya que la modificación estructural se encuentra en un sector de poca importancia en relación a la actividad antirradicalaria (Pietta, 2000; Williams y cols., 2004).

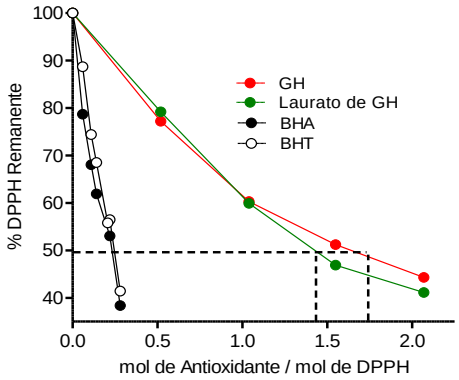


Figura 5. Porcentaje de DPPH remanente en el estado estacionario (6 h) en función de la relación molar antioxidante/DPPH inicial.

Efecto de GH y LGH frente a la peroxidación de grasa bovina

El Artículo 549 (Res 2012, 19.10.84) del C.A.A. permite el agregado de antioxidantes autorizados en las proporciones listadas en el Artículo 523 bis, cuyo máximo valor es 200 mg por kg de grasa. Este máximo será el mismo cuando los antioxidantes se utilicen solos o en mezclas. Con el fin de comparar la efectividad del glucósido de hesperetina con su éster laurato en cuanto a capacidad de retardar la oxidación lipídica se trabajó a una concentración molar (0.3 mM) igual al máximo permitido respecto a LGH (200 ppm).
Se determinó el perfil de oxidación de grasa bovina pura (control) y adicionada con GH y LGH (0.3 mM) a 50 ºC en una estufa con circulación forzada de aire. La Figura 6 presenta los resultados obtenidos.
Puede verse que el control tuvo un período de iniciación bastante corto que no se diferenció de la fase de propagación radicalaria. A partir del día 25 de incubación superó el Índice de Peróxidos de 10 meq kg^{-1}. Por su parte las muestras de grasa adicionadas con GH (140 ppm) o LGH (200 ppm) tuvieron un comportamiento claramente diferente al control. Estas muestras alcanzaron el valor máximo permitido (10 meq kg^{-1}) luego de 220 días de incubación a 50 ºC con circulación forzada de aire. Esto representa una mejora en la vida útil de la grasa del orden de 900 %. Luego, se observó un salto pronunciado, lo que significa la propagación de la autooxidación lipídica.

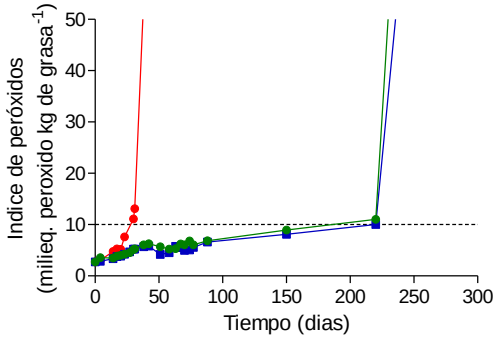


Figura 6. Índice de peróxidos en grasa bovina en función del tiempo a 50 ºC. Control (rojo), adicionada con glucósido de hesperetina 140 ppm (verde) y laurato de glucósido de hesperetina 200 ppm (azul).

CONCLUSIONES

Los compuestos GH y LGH tuvieron la misma eficiencia tanto en la actividad antirradicalaria como en la capacidad de proteger grasa bovina de la oxidación. Esto significa que la incorporación de la cadena alquílica al glucósido de hesperetina no modificó las propiedades antioxidantes de la aglicona.
Los compuestos GH y LGH protegieron la grasa bovina de la oxidación a una concentración permitida por el C.A.A., otorgándole una estabilidad 9 veces mayor que la del control.
Se concluye que ambos derivados pueden emplearse como antioxidantes en matrices grasas, supeditado a la inocuidad de los mismos. Sin embargo LGH, parecería ser más adecuado ya que además de ser antioxidante, es más soluble que GH en matrices grasas y se presume, por similitud estructural con su análogo de prunina (Céliz y cols., 2010), que tendrá actividad antibacteriana principalmente frente a bacterias patógenas Gram-positivas, lo que le permitirá conservar alimentos tanto de la oxidación como de las contaminaciones bacterianas más frecuentes.

BIBLIOGRAFÍA

Bors, W., Heller, W., Michel, C. y Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. Methods in Enzymology. A. N. G. Lester Packer, Academic Press. Volume 186: 343-355.
Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. y Berset, C. (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." *LWT - Food Science and Technology* 28(1): 25-30.
Céliz, G., Audisio, M. y Daz, M. (2010). "Antimicrobial properties of prunin, a citric flavanone glucoside, and its prunin 6″-O-lauroyl ester." *Journal of Applied Microbiology* 109(4): 1450-1457.
Céliz, G. y Daz, M. (2011). "Biocatalytic preparation of alkyl esters of citrus flavanone glucoside prunin in organic media." *Process Biochemistry* 46(1): 94-100.
Cook, N. C. y Samman, S. (1996). "Flavonoids--Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 7(2): 66-76.

Chebil, L., Anthoni, J., Humeau, C., Gerardin, C., Engasser, J.-M. y Ghoul, M. (2007). "Enzymatic acylation of flavonoids: Effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(23): 9496-9502.
Ellenrieder, G., Blanco, S. y Daz, M. (1998). "Hydrolysis of supersaturated naringin solutions by free and immobilized naringinase." *Biotechnology Techniques* 12: 63-65.
Figueroa-Espinoza, M.-C. y Villeneuve, P. (2005). "Phenolic Acids Enzymatic Lipophilization." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(8): 2779-2787.
Grompone, M. A. (1991). Propiedades físicas y químicas de las grasas bovinas fraccionadas e interesterificadas%B 1991.
Health and Human Services Secretary, N. T. P. (2011). ***Report on Carcinogens***, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program.
Horowitz, R. M. y Gentili, B. (1977). Flavonoid constituents of Citrus. Citrus Science and Technology. S. Nagy, P. E. Shaw and M. K. Veldhuis. Westport, CT, Avi Publishers. 1: 397-426.
Horwitz, W., Ed. (2005). Official methods of Analysis of AOAC International, 18th edition. Maryland, USA, AOAC International.
Iwashina, T. (2003). "Flavonoid Function and Activity to Plants and Other Organisms." *Biological Sciences in Space* 17(1): 24-44.
Macoritto, A., Robin, J., Blanco, S. y Geronazzo, H. (2004). "Obtaining of flavonoids from immature fruits of *Citrus aurantium*." *Innovación* 16(1-2): 39-42.
Molyneux, P. (2004). "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. ." *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26(2): 211-219.
Nielsen, I. L. F., Chee, W. S. S., Poulsen, L., Offord-Cavin, E., Rasmussen, S. E., Frederiksen, H., Enslen, M., Barron, D., Horcajada, M.-N. y Williamson, G. (2006). "Bioavailability Is Improved by Enzymatic Modification of the Citrus Flavonoid Hesperidin in Humans: A Randomized, Double-Blind, Crossover Trial." *Journal of Nutrition* 136(2): 404-408.
Nielsen, S. (1998). Food Analysis Second Edition. Gaithersburg, Maryland, An Aspen Publication.
Pietta, P.-G. (2000). "Flavonoids as Antioxidants." *Journal of Natural Products* 63(7): 1035-1042.
Prior, R. L., Wu, X. y Schaich, K. (2005). "Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10): 4290-4302.
Salem, J. H., Humeau, C., Chevalot, I., Harscoat-Schiavo, C., Vanderesse, R., Blanchard, F. y Fick, M. (2010). "Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters." *Process Biochemistry* 45(3): 382-389.
Vichy Laboratoires. (2012). from http://www.vichyusa.com/_us/_en/face-care/collection/liftactiv-rhamnose.aspx.
Viskupicova, J., Danihelova, M., Ondrejovic, M., Liptaj, T. y Sturdik, E. (2010). "Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods." *Food Chemistry* 123(1): 45-50.
Williams, R. J., Spencer, J. P. E. y Rice-Evans, C. (2004). "Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?" *Free Radical Biology and Medicine* 36(7): 838-849.

AGRADECIMIENTOS
Al Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Salta por el financiamiento (PI 2009). G. Céliz agradece al CONICET por su beca postdoctoral.

Estudio de ricotas con diferentes métodos de elaboración y efectividad de nisina para su preservación

Fernandez V., Mugliaroli S.L., Jagus R.J.

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ingeniería, Laboratorio de Microbiología Industrial: Tecnología de Alimentos. Argentina.
rjagus@di.fcen.uba.ar

Resumen: La ricota es obtenida a partir del suero de queso por desnaturalización de las proteínas solubles de leche. Es un alimento susceptible a la alteración microbiana que requiere la aplicación de métodos de preservación para asegurar una adecuada vida útil. Actualmente existe interés en sustituir los conservadores químicos sintéticos por antimicrobianos naturales como la nisina, un bacteriocina considerada GRAS. Este trabajo estudió las características de ricotas obtenidas por diferentes métodos y evaluó la eficacia de la nisina para controlar el desarrollo de coliformes y bacterias psiscrótrofas en ricota envasada al vacío y almacenada en refrigeración (6º C). Las ricotas fueron elaboradas con ácido acético (A) y sin ácido acético (SA) y con ácido acético y nisina (500UI/g de suero, AN). Posteriormente, se envasaron al vacío y almacenaron a 6°C durante 18 días. La ricota A presentó mayor contenido de grasa y menor pérdida de agua durante el almacenamiento que la ricota SA. En base a estos resultados, se seleccionó el método de elaboración con ácido para preparar ricota con nisina y evaluar su eficacia antimicrobiana. La nisina fue efectiva para controlar el desarrollo de bacterias psictrótrofas y coliformes por debajo de los límites aceptables hasta los 14 días de almacenamiento en refrigeración (6ºC).

Palabras clave: ricota, nisina, antimicrobianos naturales

Abstract: Ricotta is obtained from cheese whey by denaturation of the water soluble milk proteins present in whey. The product is susceptible to microbial alteration and needs the application of preservation methods to guarantee an appropriate shelf- life. Nowadays there exists interest to replace antimicrobial synthetic chemists for natural antimicrobials such as nisin, a GRAS bacteriocin. The present work studied the characteristics of ricottas obtained by different methods of production and evaluated the effectiveness of nisin to control the development of coliforms and psychrotrophs in vacuum sealed ricotta during storage under refrigeration at 6ºC. Ricottas were elaborated with acetic acid (A) and without acetic acid (SA) and, later, with acetic acid and nisina (500UI/g of whey, AN). Afterwards, ricottas were vacuum packed and stored under refrigeration (6°C) for 18 days. Ricotta A turned out to be of major content of fat and minor loss of water during storage in comparison with ricotta SA. On this basis, method A was selected to elaborate ricotta with nisin (AN) in order to evaluate its antimicrobial efficiency. Nisin proved to be effective to control psychrotrophs and coliforms growth below acceptable limits up to 14 days of storage in refrigeration (6°C).

Keywords: ricotta, nisin, natural antimicrobials.

INTRODUCCIÓN

La ricota es un queso de suero de origen italiano muy popular en Italia e Iberoamérica, incluida la Argentina. Se produce a partir del suero remanente de la elaboración de quesos y su manufactura se basa en la desnaturalización y coagulación de las proteínas solubles de la leche (principalmente de α- lactoalbúmina y β-lactoglobulina), por calentamiento a elevadas temperaturas (>85°C) y recolección de los flóculos formados en la superficie. Las proteínas del suero de queso tienen excelentes propiedades funcionales y un alto valor nutritivo debido a su excepcional contenido en lisina, triptofano y aminoácidos azufrados; además de presentar importantes contenidos de grasa, lactosa y calcio (Abrams *et al.* 2002, Miranda-Miranda *et al.* 2009). La recuperación de los nutrientes del suero y las características de los productos dependen de los métodos de elaboración de ricota empleados en cada caso, siendo las condiciones de calentamiento, el grado de acidez del suero, el agregado de leche, iones Ca^{2+} y sal, algunos de los factores de mayor importancia (Scott 1991).

Dada su elevada humedad, baja concentración de sal y pH alto (>6.0), la ricota es un alimento susceptible de alteración microbiana, por lo cual es comercializado refrigerado y, en algunos casos, envasado al vacío, en atmósferas modificadas o con agregado de conservadores. Actualmente existe interés en remplazar los

conservadores químicos sintéticos por antimicrobianos naturales como la nisina y otras bacteriocinas. La nisina es un péptido catiónico de peso molecular 3.5 kDa y está descripta como miembro de la Clase IA, el grupo que contiene a los lantibióticos (Klaenhammer 1993). Los lantibióticos de tipo A, como la nisina, son moléculas flexibles, elongadas y anfipáticas que actúan básicamente mediante la formación de poros en la membrana citoplasmática de las bacterias (Brotz y Sahl 2000). Su empleo como antimicrobiano en alimentos fue aprobado en 1969 por el Comité Experto de Aditivos de Alimentos de FAO / WHO (Thomas *et al.* 2000). En 1988 fue aprobada como aditivo de alimentos por la FDA, y aceptada como un compuesto GRAS**.** Desde entonces ha sido muy estudiada su aplicación en una gran variedad de alimentos frescos y procesados, principalmente en productos cárnicos y lácteos (Gallo *et al*. 2007, Sobrino-López y Martín-Belloso 2008).
Los objetivos de este trabajo fueron estudiar las características de ricotas obtenidas por diferentes procedimientos y la efectividad de nisina para controlar el desarrollo de bacterias coliformes y bacterias psicrótrofas en ricotas envasadas al vacío y almacenadas a 6°C.

MATERIALES Y METODOS

Queso ricota

La ricota fue elaborada en la Planta Piloto de Alimentos (U.B.A.). Se elaboraron ricotas con ácido acético (A), sin ácido acético (SA) y ricota con ácido acético y nisina (AN).
Los procedimientos empleados para cada elaboración se indican en la Figura 1. Se utilizaron para cada partida entre 80 y 100 l de suero lácteo provenientes de la elaboración de queso cuartirolo, que fueron procesados inmediatamente después de su recolección, a la salida de la desueradora.
Para la elaboración de la ricota A se siguió el procedimiento esquematizado en la Figura 1, El suero fue volcado en una tina de acero inoxidable y se ajustó el pH a un valor de aproximadamente de 6,5 - 6,6 con hidróxido de sodio 10%m/v. El calentamiento se efectuó con vapor de agua. El suero se mezcló con leche entera (provista por La Serenísima, leche:suero 5:100) y, posteriormente, se fueron incorporando los otros aditivos. Se agregaron, sal (0,7 kg cada 100 l de suero), cloruro de calcio (en escamas de uso industrial, EFICE S.A., Uruguay, 25 g cada 100 l de suero) y ácido acético (Cicarelli®, 17,5 ml cada 100 l de suero). Una vez formados los flóculos, se retiraron cuidadosamente con una pala de extracción, se colocaron en canastos para permitir el desuerado y se cubrieron con lienzos. Se almacenaron en refrigeración durante 24 h y, posteriormente, se fraccionaron y almacenaron al vacío en bolsas (donada por Sealed Air, permeabilidad al oxígeno: 3.000/5.000 cm^3/m^2 por atmósfera por día) con envasadora de vacío (Ehrlich, New, Argentina). Las muestras se almacenaron a 6ºC durante 18 días y se realizaron análisis microbiológicos a diferentes intervalos de tiempo.
Las ricotas SA y AN se prepararon de acuerdo a procedimientos similares al anteriormente descripto. En la Figura 1 se muestran las modificaciones para cada una de las elaboraciones. En el caso de la ricota AN, se incorporó nisina (Delvo®PlusNisin, donada por DSM- Netherlands; 500UI/g de suero) durante la elaboración.

Análisis físico-químicos

La preparación de las muestras de ricota se llevó a cabo según el procedimiento establecido en AOAC (1995). Se determinaron pH (pHmetro digital Hanna, HI99163 y electrodo FC232D) que fue insertado directamente en la ricota para efectuar la medición, humedad (secado en estufa de vacío a 100±2ºC hasta peso constante), proteínas (Kjeldahl) y grasas (Roese-Gottlieb) de acuerdo a AOAC (1995). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.
El desuerado durante el almacenamiento se midió como la pérdida de agua a los 18 días de almacenamiento y se determinó según el siguiente procedimiento. Se pesaron 10 g de ricota, se centrifugó 10 minutos a 10.000 rpm (Eppendorf 5804 R), se midió el volumen de agua separada. La determinación se realizó por triplicado y el resultado se calculó como volumen de agua separada cada 100 g de ricota.
El rendimiento de las elaboraciones se calculó teniendo en cuenta la masa total de materias primas empleadas y la masa de ricota obtenida en cada elaboración.

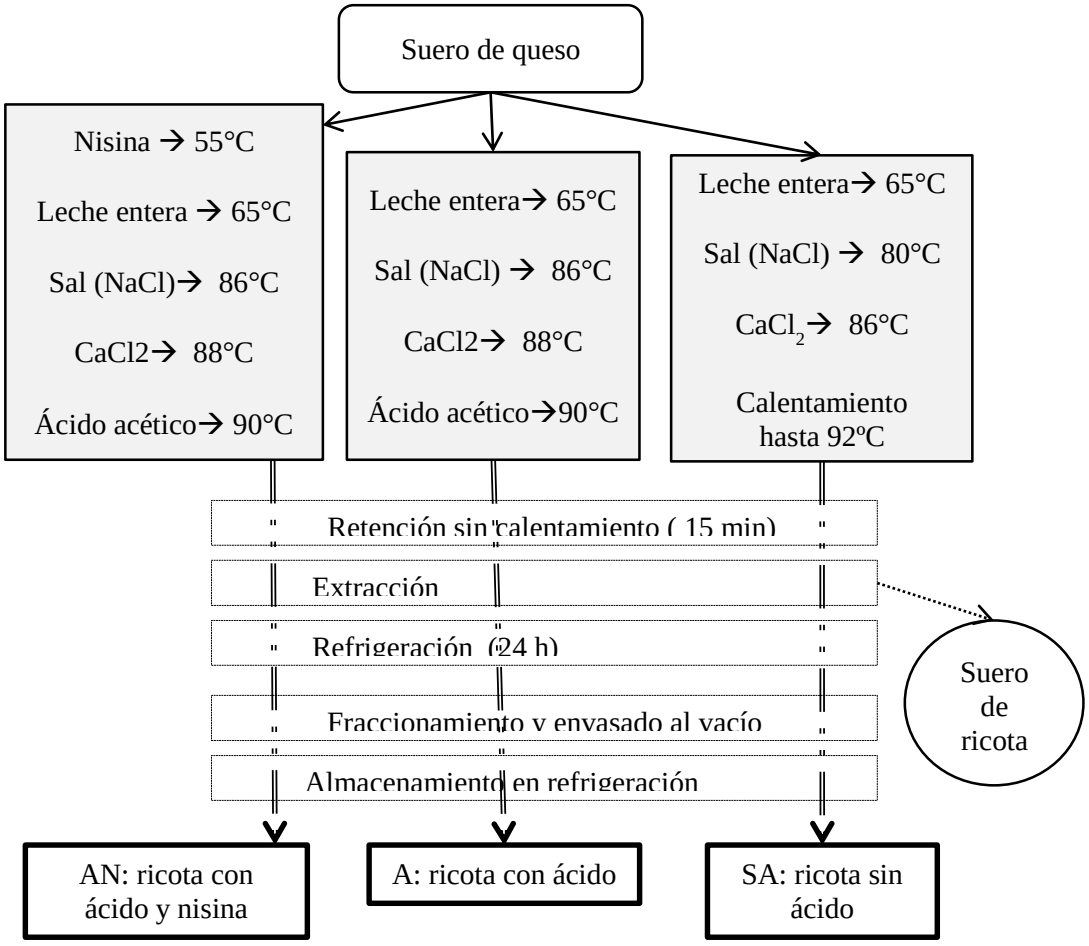


Figura 1: Procedimientos de elaboración de ricota con ácido (A), ricota con ácido y nisina (AN) y ricota sin ácido (SA)

Análisis microbiológicos

A cada tiempo evaluado, se transfirieron asépticamente 10g de muestra a bolsas de stomacher estériles, se agregaron 90 ml de agua peptonada 0,1% estéril y se homogeneizaron en stomacher (Interscience Laboratories Inc. Bagmixer® 400 P,Francia) por 60 segundos. Se prepararon diluciones decimales con agua peptonada 0,1% estéril y se sembraron por duplicado en los medios de crecimiento para realizar los recuentos microbianos.

El recuento de bacterias psicrótrofas se determinó en agar para recuento total (Biokar Diagnostics Francia, 20ºC, 5 días) (Wehr 1992, Jay JM 2002); recuento de bacterias coliformes totales en agar bilis rojo neutro cristal violeta lactosa (Merck, 35°C, 24h) (Wehr 1992); recuento de bacterias coliformes totales por la técnica del número más probable (NMP) en caldo lactosa Verde Brillante 2% sales biliares (Biokar Diagnostics Francia, 30°C, 24-48h) (FIL- IDF 1985); recuento de coliformes a 44°C por la técnica del número más probable (NMP) en caldo lactosa Verde Brillante 2% sales biliares (Biokar Diagnostics Francia, 45°C, 24h)(FIL-IDF 1985); recuento de mohos y levaduras en agar extracto de levadura-glucosa-cloramfenicol (Biokar Diagnostics Francia, 28°C, 3 a 5 días) (FIL-IDF 1990); *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva (FIL-IDF 1990) y *Salmonella spp*. (FIL-IDF 1985). Los resultados fueron expresados como log de unidades formadoras de colonia por gramo de ricota (log UFC/g).

Tratamiento de datos

Se empleó el test de Student de dos poblaciones (software Origin 6.0) para la comparación de los promedios de los datos de humedad, grasa, proteínas, pH, pérdida de agua de las ricotas A y SA y se determinaron las diferencias significativas a $p<0,05$.

Los datos de análisis microbiológicos se informan en las figuras como promedio y desviación estandard de log N, siendo N el número de unidades formadoras de colonias por gramo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presentan los valores correspondientes a los análisis físico-químicos de las ricotas elaboradas con y sin agregado de ácido acético.

Tabla 1: Caracterización de las ricotas con agregado de ácido (A) y sin agregado de ácido (SA).
Cada valor es el promedio ± la Desviación Standard de los resultados obtenidos.

Componente	Ricota A*	Ricota SA*
% Grasa	17,2 ± 0.3[a]	14,0 ± 0.1 [b]
% Humedad	69,5 ± 0.5	72,1 ± 0.2
% Proteínas	8,6 ± 0,5	8,3 ± 0,4
% Pérdida de agua	5 ± 0 [c]	13 ± 3 [d]
Rendimiento (%)	3,06	3,13
pH inicial	6,57 ± 0,01 [e]	6,74 ±0,04 [f]

Los datos señalados con letras diferentes presentan diferencias significativas ($p<0,05$)

Ambos procedimientos permitieron obtener productos de elevado valor nutricional con una buena recuperación de proteínas. En relación a la importancia de las condiciones del procedimiento de elaboración respecto de la recuperación de proteínas y rendimiento del proceso, Vázquez Puente *et al.* (2010) estudiaron la influencia de las condiciones de calentamiento y de la acidez inicial del suero de leche. Estos investigadores evaluaron el efecto de diferentes temperaturas de calentamiento (73, 83 y 93ºC) y observaron que los mejores resultados se obtenían aplicando la mayor temperatura durante 15 minutos.

Si bien ambas ricotas resultaron similares, el procedimiento con ácido (ricota A) presentó mayor contenido de grasa y menor desuerado, que la ricota obtenida por el método sin ácido acético (ricota SA). Dado que estas características fueron consideradas de importancia, fundamentalmente desde el punto de vista de aceptabilidad sensorial, se eligió el procedimiento con ácido para estudiar la efectividad de la nisina en la conservación de la ricota.

La ricota con nisina (AN) no presentó diferencias en cuanto al rendimiento, contenido de proteínas, grasa, humedad, pH ni pérdida de agua respecto a la ricota elaborada con ácido acético (A).

En cuanto al aspecto microbiológico, todas las ricotas recién elaboradas fueron analizadas para comprobar su aceptabilidad microbiológica según Código Alimentario Argentino (CAA) (Código Alimentario Argentino 2006). Dado que el CAA no fija límites microbiológicos específicos para ricota, se tuvieron en cuenta los correspondientes al art. 605 para quesos de muy alta humedad (humedad > 55%) sin bacterias lácticas en forma viable y abundante. En todas las muestras de ricota los resultados obtenidos estuvieron dentro de los límites permitidos y resultaron NMP coliformes a 30°C <0,03/g; NMP coliformes a 45°C <0,03/g; mohos y levaduras <10 UFC/g; *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva <100 UFC/g y ausencia de *Salmonella* spp.en 25 g.

Durante el almacenamiento de las ricotas elaboradas con ácido (A) y con ácido y nisina (AN) se evaluó el desarrollo de la flora psicrótrofa y coliforme como indicadores de vida útil del producto. Distintos investigadores han utilizado diferentes parámetros para determinar la vida útil en quesos. Papaioannou *et al*. (2007) estudiaron la vida útil de queso de suero envasado al vacío y en dos atmósferas modificadas analizando el desarrollo de las bacterias mesófilas totales, bacterias lácticas, enterobacterias, pseudomonas, y levaduras/ hongos durante el almacenamiento. Paralelamente evaluaron la calidad sensorial (aroma y sabor) de los quesos en ese período y concluyeron que los valores sensoriales correlacionaban bien con los microbiológicos. Hough *et al.* (1999) analizaron la vida útil sensorial y microbiológica de ricotas argentinas y encontraron que existía una buena correlación entre el crecimiento de las bacterias mesófilas totales y los cambios en sabor y acidez. Estos autores destacan que los valores de corte de vida útil deben considerar varios factores, particularmente las características sensoriales y las especificaciones legales fijadas por el CAA a las que el producto debe ajustarse durante toda su vida comercial.

En lo que respecta a nuestro trabajo, se realizaron algunos ensayos previos para decidir qué determinaciones se emplearían en el análisis de vida útil. Se llevaron a cabo análisis de varios grupos microbianos en ricota almacenada en refrigeración (resultados no mostrados). Se estudiaron bacterias psicrotrofas, mesófilas proteolíticas, lácticas, coliformes y mohos y levaduras y se comprobó que las bacterias mesófilas

proteolíticas y las psicrótrofas mostraban comportamientos similares y eran los grupos que presentaban mayor velocidad de crecimiento alcanzando la densidad máxima poblacional antes que los otros microorganismos. Estos resultados fueron coincidentes con los observados por Schmidt *et al*. (1992) y Dermiki *et al*. (2008), quienes evaluaron la vida útil de quesos de características similares a la ricota a través de análisis sensoriales y microbiológicos. Comprobaron que el desarrollo de la flora mesófila se debía al aumento de bacterias psicrótrofas y, a su vez, que este grupo microbiano era el responsable de la producción de metabolitos causantes de olores y sabores desagradables en el producto. Si bien el CAA no fija límites para bacterias psicrótrofas en quesos, en este trabajo se tomó 5 log UFC/g. ya que es el estipulado por este código para bacterias mesófilas en productos relacionados (crema, leche y helados), mientras que otros autores emplean como límite valores aún superiores, 5 log UFC/g (ICMSF 1986).

En la Figura 2 se muestra la evolución de la flora psicrótrofa en ambos productos. La contaminación inicial detectada fue baja, 1,4 -1,9 log UFC/g para AN y A respectivamente, evidenciando buenas condiciones de trabajo en cuanto a la higiene y a la refrigeración durante la estabilización del producto desde su producción hasta el envasado.

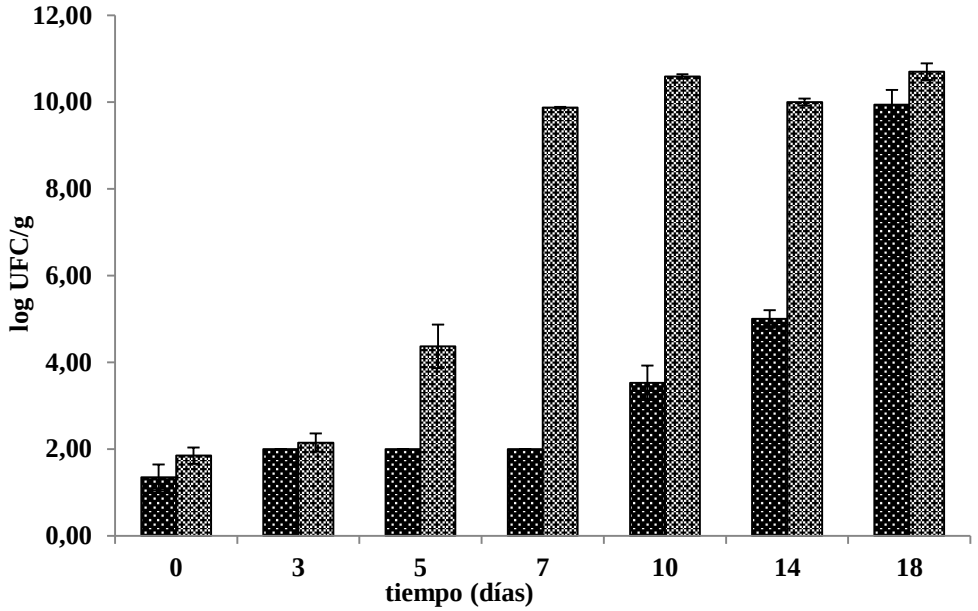


Figura 2: Evolución de la flora psicrótrofa en ricota A y ricota AN

Como se desprende de la Figura 2, la ricota A superó el límite fijado al séptimo día (9,9±0,1 log UFC/g) mientras que la incorporación del antimicrobiano permitió que AN recién alcanzara el límite máximo (5,0±0,6 log UFC/g) el día 14 del almacenamiento. Resultados similares fueron observados por Samelis *et al*. (2003) quienes estudiaron el efecto antimicrobiano de distintos tratamientos de nisina sobre *Listeria monocytógenes* y la flora mesófila en queso de suero griego Anthotyros almacenado en refrigeración. Durante el almacenamiento la flora total aumentó en todos los tratamientos y llegó a exceder los 8 logUFC/g excepto en quesos elaborados con 500UI nisina/g de suero.

La Figura 3 muestra los recuentos de las bacterias coliformes en las ricotas con y sin nisina durante el almacenamiento a 6°C.

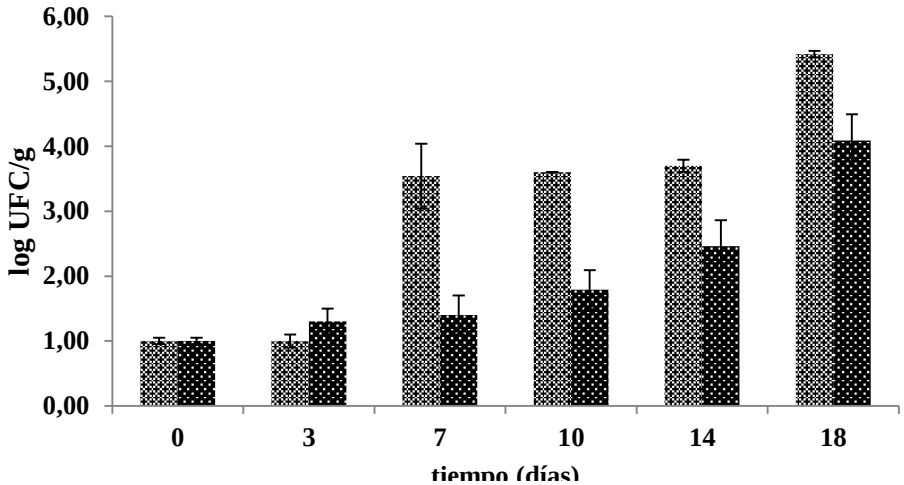


Figura 3: Evolución de la flora coliforme en ricota A y ricota AN

La investigación de bacterias coliformes en quesos y productos lácteos es de interés dada su relevancia como grupo de indicadores de prácticas higiénicas en la elaboración y de abuso de temperatura durante el almacenamiento. En base al criterio microbiológico establecido por el CAA para este tipo de alimentos y al considerado por otros autores (Hough *et al.* 1999) se tomó 3,00 log UFC /g como valor límite de bacterias coliformes.

La ricota A alcanzó un recuento de coliformes de 3,5± 1,0 logUFC/g el séptimo día de almacenamiento a 6°C. El agregado de nisina en la elaboración permitió demorar el desarrollo de bacterias coliformes y AN mostró una contaminación de 2,5±1,2 log UFC/g al día catorce y de 4,1±1,5 log UFC/g al día dieciocho.

La nisina demostró cierta efectividad contra este grupo microbiano ya que demoró su desarrollo durante el almacenamiento. Varios autores, entre ellos Blackburn *et al.* (1989), Kalchayanand *et al.* (1992) y Delves-Broughton *et al.* (1992) han hecho referencia a mecanismos por los cuales la nisina puede resultar activa frente a microrganismos naturalmente resistentes a ella. En el caso de las bacterias gram negativas, la nisina debería atravesar la membrana externa y la pared celular, normalmente impermeables a ella, para tener acceso a la estructura blanco de su acción antimicrobiana: la membrana citoplasmática. En este sentido tratamientos que empleen agentes quelantes, ácidos orgánicos congelación ó procesos térmicos subletales podrían resultar efectivos al favorecer la desorganización de la membrana externa. En este caso se puede pensar que el tratamiento térmico favoreció la actividad de la nisina sobre las bacterias coliformes.

El desarrollo microbiano puede influir en la variación de la acidez o del pH del producto. Dermiki *et al.* (2008) observaron que la variación del pH de quesos Myzithra Kalathaki almacenados en atmósferas de diferente composición de CO_2/N_2 dependía del tipo de flora microbiana que se desarrollaba en el producto. Por ejemplo, las muestras con atmósferas de envasado con mayor proporción de CO_2 mostraron recuentos más altos de bacterias lácticas y menores valores de pH. En nuestro estudio, se estudió el pH de las ricotas A y AN durante el almacenamiento y su posible correlación con el desarrollo de algún grupo microbiano durante este periodo. Los valores se mantuvieron prácticamente sin cambios, cercanos a los iniciales (6,57 (A) y 6,69 (AN)). Este hecho puede explicarse teniendo en cuenta que durante el almacenamiento hubo desarrollo simultáneo de bacterias proteolíticas (productoras de compuestos nitrogenados, muchos de ellos de características básicas) y bacterias lácticas (productoras de metabolitos ácidos).

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demostraron que la elaboración de ricota a partir de suero de queso por los métodos ensayados permitió la obtención de un producto de alto valor nutritivo con buena recuperación de las proteínas del lactosuero. Se comprobó que la incorporación de nisina al suero en la elaboración no afectó al producto en cuanto a su composición de nutrientes y le confirió estabilidad microbiológica, demorando el desarrollo microbiano. El empleo de nisina en la elaboración permitió extender la vida útil controlando el crecimiento de las bacterias psicrótrofas y coliformes dentro de los valores de aceptabilidad establecidos durante 14 días en la ricota envasada al vacío y almacenada en refrigeración.

BIBLIOGRAFÍA

Abrams SA, Griffin IJ, Davila PM. 2002. Calcium and zinc absorption from lactose-containing and lactosefree infant formulas. Am J Clin Nutrition, 76: 442–446.

AOAC International. 1995 Official Methods of Analysis of the Association of Oficial Analytical Chemists. Washington, D.C: Arlington Va.: AOAC International, cap. 33, pag 58,61, 63.

Blackburn P, Polak J, Gusik J, Rubino S D. inventors. Nisin compositions for use **as** enhanced, broad range bacteriwides. Appl. Microbiology, Inc. 1989. New York, US. Int. Pat. Appl. No. PCT/LJs89/02625; Int. Publ. No. W089/12399.

Brotz H, Sahl HG. 2000. New insights into the mechanism of action of lantibiotcs- diverse biological effects by binding to the same molecular target. Journal Antimicrobial Chemotherapy, 46: 1-6.

Código Alimentario Argentino. 2006. Buenos Aires: De La Canal y Asociados SRL. Capítulo VIII. Alimentos Lácteos. Art. 605

Delves- Broughton J, Williams GC, Wilkinson S. 1992. The use of bacteriocin, nisin as a preservative in pasteurized liquid whole egg. Letts. Appl. Microbiol, 15: 133-136

Dermiki M, Ntzimani A, Badeka A, Savvaidis IN, Kontominas MG. 2008. Shelf-life extension and quality attributes of the whey cheese "Myzithra Kalathaki" using modified atmosphere packaging. LWT - Food Science and Technology, 41(2): 284-294.

FIL-IDF. 1985. Recuento de coliformes. Norma FIL-IDF: 73A:1985. Determinación de Salmonella Norma FIL-IDF: 93A : 1985

FIL-IDF 1990. Federación Internacional de Lechería. Recuento de *Staphylococcus aureus.* Norma FIL-IDF 145:1990. Recuento de Mohos y levaduras. Norma FIL- IDF 94 B: 1990.

Gallo LI, Pilosof AMR, Jagus RJ. 2007. Effective control of *Listeria innocua* by combination of nisin, pH and low temperature in liquid cheese whey. Food Control. 18: 1086-1092.

Hough G, Puglieso ML, Sanchez R, Mendes da Silva O. 1999. Sensory and Microbiological shelf-life of a comercial ricotta cheese. Journal Dairy Science. 82: 454-459.

ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Sampling for microbiological analysis: Principles and scientific applications. 1986. 2a ed. Toronto: University of Toronto Press. Vol. 2.

Jay J.M. 2002. A review of aerobic and psychrotrophic plate count procedures for fresh meat and poultry products. Journal of Food Protection 65(7):1200-6.

Kalchayanand N, Hanli MB, Ray B. 1992. Sublethal injury makes Gramnegative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins,pediocin AcH and nisin. Letters in Applied Microbiology, 16: 239–243.

Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 12: 39-86.

Miranda Miranda O, Ponce Palma I, Fonseca Palma PL, Cutiño Espinosa M, Díaz Lara RM ,Cedeño Agramonte C. 2009. Características fisico-químicas de sueros de queso dulce y ácido producidos en el combinado de quesos de Bayamo. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición,19(1): 21-25.

Papaioannou G, Chouliara I, Karatapanis AE, Kontominas MG, Savvaidis IN. 2007. Shelf-life of a Greek whey cheese under modified atmosphere packaging. International Dairy Journal. 17: 358–364.

Samelis J, Kakouri A, Rogga KJ, Savvaidis IN, Kontominas MG. 2003. Nisin treatments to control Listeria monocytogenes post-processing contamination on Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4°C in vacuum packages. Food Microbiol, 20: 661-669.

Schmidt K, Bouma J. 1992. Estimating Shelf-Life of Cottage Cheese Using Hazard Analysis. J Dairy Sci. 75: 2922-2927.

Scott R. 1991. Fabricación de queso. Zaragoza. Acribia. pag. 520.

Sobrino-López A, Martín-Belloso O. 2008. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. International Dairy Journal, 18: 329–343.

Thomas LV, Clarkson MR, Delves-Broughton J. 2000. Nisin. En: Naidu AS, editores. Natural Food Antimicrobial Systems. Boca Raton, USA: CRC Press, pag .463-524.

Vazquez Puente F., Villegas Arroyo G.A., Mosqueda Frias P.R. 2010. Precipitación de proteínas lactoséricas en función de la acidez, temperatura y tiempo, de suero producido en Comonfort, Guanajuato, México. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1 (2): 157-169.

Wehr HM, editores. 1992. Standard methods for dairy APHA (American Public Health Association) 17ª ed. Washington DC: APHA American Public Health Association, cap. 7.

AGRADECIMIENTOS
Los autores agradecen el apoyo económico de la Universidad de Buenos Aires y de la Agencia Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Estabilidad oxidativa de aceites mezcla girasol-chía con adición de antioxidantes (extracto de romero y palmitato de ascorbilo) durante su almacenamiento

Guiotto E.N. [1,2], Ixtaina V.Y. [1,2], Nolasco S.M. [2], Tomás M.C. [1]

1: Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) - CONICET- (FCE-UNLP)
2: TECSE. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.
esnagui@hotmail.com

Resumen: A fin de evaluar la estabilidad de aceites mezcla girasol-chía (90:10 y 80:20) frente a la oxidación, se llevó a cabo un ensayo de almacenamiento a dos niveles de temperatura habitualmente empleadas, de refrigeración (T=4±1ºC) y ambiente (T=20±2ºC), con el agregado de antioxidantes tales como palmitato de ascorbilo (AP, 2000 ppm), extracto de romero (ER, 5000 ppm) y su mezcla (AP:ER 2000:2000 ppm). Periódicamente se determinaron los índices de peróxido (PV), *p*-anisidina (*p*-AV) y valor total de oxidación (Totox). Los aceites mezcla girasol-chía con antioxidantes almacenados a 4±1ºC, presentaron PV ≤ 10,0 meq O_2/kg aceite; los menores valores de PV se evidenciaron en las mezclas con AP:ER. Durante el almacenamiento a 20±2ºC, el límite máximo legislado de PV fue alcanzado entre los 120 y 240 días de almacenamiento en el siguiente orden: control, con agregado de ER, AP y AP:ER para ambas mezclas de aceite. Los valores de *p*-AV de los aceites almacenados a 4±1ºC se mantuvieron en niveles bajos mientras que a 20±2ºC se registraron los mayores incrementos de este parámetro. Con respecto a la oxidación total de los aceites almacenados a 4±1ºC con agregado de antioxidantes, los mismos presentaron valores Totox < 28,0; mientras que a 20±2ºC se alcanzaron niveles de 85,0.

Palabras clave: Aceites mezcla, antioxidantes, estabilidad oxidativa, almacenamiento

Abstract: Storage of sunflower-chia oil blends (90:10 and 80:20) was carried out to assess the oxidative stability at two temperature levels normally used, cooling (T = 4±1°C) and room temperature (T = 20±2 °C), with the addition of antioxidants such as ascorbyl palmitate (AP, 2000 ppm), rosemary extract (ER, 5000 ppm), and their mixtures (AP:ER, 2000:2000 ppm). Then, peroxide (PV), *p*-anisidine (*p*-AV) and Totox values were determined. Sunflower- chia oil blends with antioxidants stored at 4 ± 1 ° C showed PV ≤ 10.0 meq O_2/kg oil, the lowest values of PV were found in blends with AP:ER. During storage at 20±2 °C, the maximum level of PV legislated was reached between 120 and 240 days of storage in the following order: control oil blends, with ER, AP, AP:ER. The *p*-AV values of oils stored at 4±1 °C presented low levels, while at 20±2 °C an important increase was recorded for this parameter. Total oxidation of oils stored at 4±1 °C with the addition of antioxidants showed Totox < 28.0 whereas at 20±2 °C reached levels of 85.0.

Keywords: oil blends, antioxidants, oxidative stability, storage

INTRODUCCIÓN

El aspecto nutricional de los aceites comestibles y el impacto que sus constituyentes mayoritarios y/o minoritarios pueden ejercer sobre la salud reciben cada día mayor interés de parte de los consumidores, para lo cual es importante formular nuevas composiciones de aceite vegetal mejorando la estabilidad y valor nutritivo (Frankel y Huang 1994). Estudios de la FAO-OMS (1997) han determinado una carencia y/o deficiencia de los ácidos grasos esenciales linoleico y ácido α-linolénico debido a la alimentación desbalanceada que caracteriza las dietas occidentales. Así, por cada unidad de ácidos grasos ω-3 deberían consumirse de 5 a 10 unidades de ω-6.

El aceite de girasol (*Helianthus annuus* L.) es uno de los aceites vegetales habitualmente consumidos en nuestro país, el cual contiene entre 65-70% de ácido linoleico -obtenido a partir de las variedades tradicionales- (Gunstone 2002). El aceite extraído a partir de la semilla de chía (*Salvia hispanica* L.) exhibe un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), especialmente ácido α-linolénico (~ 60%) (Ayerza 1995). Su incorporación en la dieta a través de aceites mezclas con aceite de girasol sería una alternativa para aumentar su consumo y mejorar la relación ω-6/ω-3 en la dieta. La composición de ácidos grasos es tal que puede obtenerse un aceite para ensaladas de excelente valor nutricional para un aceite comercial (Taga *et al*. 1984).

La estabilidad de los aceites vegetales está principalmente determinada por su grado de insaturación y por el balance en las sustancias prooxidantes y antioxidantes presentes en los mismos. Los ácidos grasos son más susceptibles a la oxidación a medida que aumenta el grado de insaturación o número de dobles enlaces en su cadena hidrocarbonada. La oxidación de los ácidos grasos insaturados es uno de los principales procesos de deterioro de origen químico que pueden afectar la calidad de los alimentos. Este tipo de proceso puede producir pérdidas del valor nutricional así como también cambios en las características organolépticas y propiedades funcionales (Ixtaina *et al*. 2011). La oxidación de los aceites es uno de los procesos de deterioro más importantes, ya que además de modificarse las propiedades funcionales del aceite, genera la formación de compuestos volátiles que imparten olores y sabores indeseables, lo que limita su vida útil. Además, los productos formados en este proceso han sido asociados con desórdenes fisiológicos tales como el envejecimiento y enfermedades como la arterosclerosis y carcinogénesis (Ortega Nieblas *et al.* 2001).

Las semillas oleaginosas producen de forma natural sustancias con propiedades antioxidantes, dentro de las que se destacan los tocoferoles. Existen en la naturaleza cuatro formas diferentes de tocoferoles (α-, β-, γ- y δ-tocoferol) los que difieren entre sí por el número y posición de grupos metilo (Me) en el anillo cromano. Se han encontrado diferencias entre los cuatro tipos de tocoferoles en relación con su actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Así, α-tocoferol se caracteriza por poseer la máxima eficacia como antioxidante *in vivo* o vitamina E, pero su actividad *in vitro* es baja en comparación con la de otros tocoferoles mientras que la mayor actividad antioxidante *in vitro* corresponde a γ- tocoferol (Velasco Varo *et al.* 2010).

En el mercado hay disponible diversos antioxidantes de origen sintético o natural que pueden mejorar la estabilidad oxidativa de los alimentos grasos retrasando el proceso de oxidación. Así, el extracto de romero (ER) contiene un gran número de compuestos tales como el ácido carnósico, carnosol y ácido rosmarínico, los cuales representan una importante fuente de antioxidantes naturales utilizados comercialmente en alimentos (Ixtaina *et al.* 2011). El palmitato de ascorbilo (AP) es un derivado sintético, soluble en aceite. Los mecanismos por los que estos antioxidantes están implicados en el control del proceso de autooxidación son diferentes. El ER actúa como atrapante de radicales libres, mientras que el AP actúa como secuestrador de oxígeno (Shahidi 1997).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente estudio se realizó a fin de lograr un producto con un adecuado balance de ácidos grasos ω-6/ω-3 y estabilidad oxidativa a través de mezclas con distinta proporción de aceite de girasol y chía, con adición de antioxidantes (ER, AP y AP:ER (1:1)).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia de la temperatura, el tiempo de almacenamiento y la efectividad de los antioxidantes sobre los aceites mezcla girasol-chía mediante la determinación de la evolución de los compuestos primarios y secundarios de oxidación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

En el presente estudio se utilizaron aceites de semilla de chía (Nutracéutica Sturla S.R.L., Argentina) y de girasol (Molinos Río de la Plata, Argentina). El extracto de romero (Guardian™ 201) y el palmitato de ascorbilo (Grindox™ 562) fueron suministrados por Danisco. El extracto de romero utilizado (oleosoluble) está compuesto por 4% (p/p) de diterpenos fenólicos y un vehículo constituido por mono- y diacilgliceroles; ésteres de ácido acético de mono y diacilgliceroles y propilenglicol. Grindox TM 562 es un antioxidante soluble en grasas y aceites constituido por una mezcla de 10% de palmitato de ascorbilo y 90% de un "carrier" compuesto por propilen glicol y monoleato de sorbitán como agente emulsificante.

Preparación de la muestras

Se prepararon mezclas de aceite girasol-chía (90:10, 80:20 p/p) agitando adecuadamente para homogeneizar los aceites. Luego se adicionaron el extracto de romero (ER), palmitato de ascorbilo (AP) y su mezcla (AP:ER 1:1) en las siguientes concentraciones: 5000, 2000 y 2000:2000 ppm, respectivamente. Todas las muestras fueron almacenadas en frascos de vidrio color ámbar de 30 mL de capacidad, para evitar la incidencia directa de la luz, en atmósfera de nitrógeno a 4±1 y 20±2ºC durante un periodo de 12 meses, realizándose periódicamente las respectivas tomas de muestra por duplicado para su posterior análisis.

Composición acídica

El perfil de ácidos grasos fue determinado mediante cromatografía gaseosa (CG) utilizando un cromátografo Hewlett Packard modelo 6890 con detector de ionización de llama (FID detector) de acuerdo a los métodos IUPAC 2.301 y 2.302 (IUPAC 1992). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron obtenidos por

derivatización de los triglicéridos por metanólisis alcalina y posterior esterificación de los ácidos grasos libres en medio ácido.

Contenido de tocoferoles

El contenido de tocoferoles fue determinado mediante una técnica cromatográfica basada en las normas AOCS Ce 8-89 (AOCS 1998). Las muestras de aceite fueron disueltas en hexano para su posterior cuantificación por HPLC con detector de fluorescencia (λ excitación: 290 nm, λ emisión: 330 nm).

Se utilizó un cromatógrafo HPLC Hewlett Packard Serie 1050, columna fase normal Lichrosob Si-60 (25 x 0,4 cm; 5 μm de tamaño de partícula); fase móvil: *n*-hexano:isopropanol (99,5:05 v/v); velocidad de flujo de 1,5 ml/min; 20 μl de volumen de inyección.

Indice de Peróxido (PV)

Los productos primarios de oxidación (hidroperóxidos) contenidos en el aceite fueron determinados mediante el índice de PV de acuerdo a las normas AOCS Cd 8-53 (AOCS 1998) y expresados como miliequivalentes de peróxidos por kilogramo de aceite.

Valor de *p*-anisidina (*p*-AV)

La formación de los productos secundarios de la oxidación, principalmente 2- alquenal, fueron determinados por *p*-AV, basada en la reacción de color entre el reactivo anisidina y los compuestos secundarios de la oxidación según el método AOCS Cd 18-90 (AOCS 1998).

Valor total de oxidación (Totox)

Este valor brinda información sobre la historia pasada de un aceite (a través del valor de *p*-AV) con su estado presente (mediante el PV). Así, la determinación del valor Totox ha sido llevada a cabo para estimar el deterioro oxidativo de diversos alimentos grasos (Rossell 1983). El Totox se define según la siguiente ecuación: $\text{Totox} = 2\text{PV} + p - \text{AV}$ **(1)**

Todos los análisis se realizaron por duplicado.

Análisis estadístico

Las determinaciones fueron realizadas por triplicado. Se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) y test de Tukey ($p \leq 0,05$) para la comparación de medias. Se utilizó el programa informático Statgraphics Plus 4.0. Manugistics Inc., USA (1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra el perfil de ácidos grasos de los diferentes aceites ensayados. El aceite de girasol presenta un perfil constituido principalmente por los ácidos linoleico (C 18:2) y oleico (C 18:1), mientras que el aceite de chía tiene un elevado contenido de ácido α-linolénico (C 18:3, ω-3), el cual representa el 65% de los ácidos grasos totales. Las mezclas girasol-chía 80:20 y 90:10 contienen alrededor del 17,0 y 8,5% de C18:3 respectivamente, correspondiéndose con relaciones ω-6/ω-3 de 5,3:1 y 2,7:1. respectivamente.

En la Tabla 1, se observa el perfil de tocoferoles correspondientes a los aceites vegetales estudiados. El aceite de girasol posee mayoritariamente α-tocoferol (99,2%) por tanto, se trata de un aceite con alto poder vitamínico pero muy susceptible al enranciamiento oxidativo. El aceite de chía presenta un alto contenido de γ-tocoferol representando 98,3% de los tocoferoles totales. Los aceites mezcla girasol-chía 80:20, presentaron un contenido del 14 a 16% de γ-tocoferol y más del 81% de α-tocoferol respecto a los tocoferoles totales, mientras que los aceites mezcla 90:10 presentaron < 6% de γ-tocoferol y > 94% de α-tocoferol.

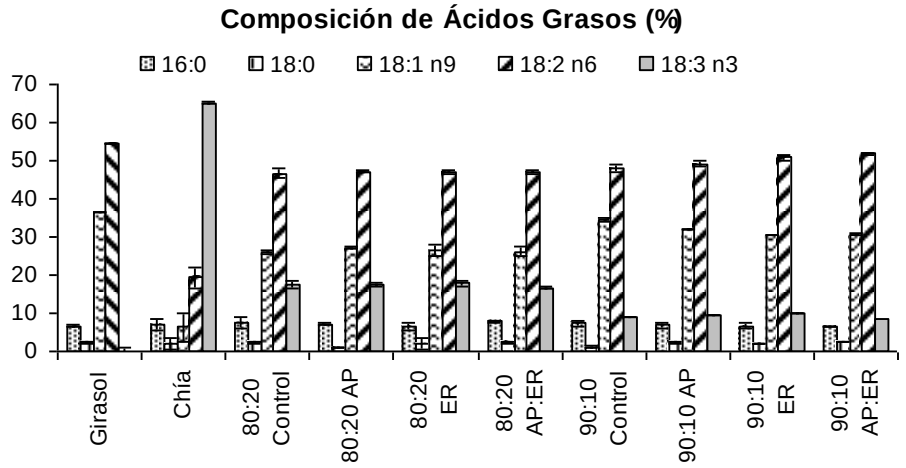


Figura 1. Composición de ácidos grasos de los diferentes aceites: girasol, chía y sus mezclas (90:10 y 80:20) con el agregado de antioxidantes (ER, AP y AP:ER)

Tabla 1. Contenido de tocoferoles de los aceites mezclas

Muestra	**[α] µg/g**	**[β] µg/g**	**[γ]µg/g**	**[δ] µg/g**	**Totales µg/g**
Girasol	498,44^{d}	4,03^{ab}	nd	nd	502,47^{d}
Chía	nd	nd	403,81^{c}	7,11^{b}	410,92^{a}
80:20 Control	376,28^{a}	5,87^{bc}	71,85^{b}	nd	454,00^{bc}
80:20 AP	399,44^{ab}	7,33^{c}	78,05^{b}	3,11^{a}	487,93^{cd}
80:20 ER	376,42^{a}	6,27^{bc}	62,25^{b}	2,22^{a}	447,16^{abc}
80:20 AP:ER	375,52^{a}	5,33^{bc}	65,32^{b}	nd	446,16^{ab}
90:10 control	422,38^{bc}	1,62^{a}	9,55^{a}	nd	433,55^{ab}
90:10 AP	432,43^{c}	4,67^{bc}	21,85^{a}	nd	458,96^{bc}
90:10 ER	436,77^{c}	6,79^{bc}	27,34^{a}	nd	470,89^{bcd}
90:10 AP:ER	434,77^{c}	3,88^{ab}	19,18^{a}	nd	457,83^{bc}

Valores promedio (n=2). Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las muestras. nd: no detectado

En las Figuras 2 a 4 se muestran los valores correspondientes a la evolución de los parámetros estudiados en relación al seguimiento de la oxidación durante el periodo de almacenamiento, en los diferentes sistemas estudiados.

Los aceites mezcla girasol-chía con adición de diferentes antioxidantes, almacenados a 4±1ºC, presentaron valores promedio de PV ≤ 10,0 meq O_2/kg aceite, nivel establecido por el Código Alimentario Argentino como el límite máximo apto para el consumo humano. A dicha temperatura las mezclas girasol-chía con AP:ER evidenciaron los menores PV, los cuales resultaron significativamente menores ($p \leq 0,05$) a lo largo del almacenamiento. Resultados similares se obtuvieron con el agregado de AP los cuales no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto a las muestras con AP:ER hasta los 180 días (mezclas girasol-chía 90:10) y a partir de los 270 días en las mezclas 80:20. Además, se observó un aumento en la velocidad de la oxidación primaria de los aceites mezcla control (sin agregado de antioxidantes) a partir de los 90 días de almacenamiento, registrando diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto a las mezclas girasol-chía con la incorporación de antioxidantes (Figura 2a).

Los aceites mezclas girasol-chía control no presentaron una marcada diferencia entre sí en todos los tiempos ensayados a pesar de su diferente composición en ácidos grasos y contenido de tocoferoles. Este hecho puede atribuirse al contenido de tocoferoles naturales, principalmente γ-tocoferol el cual posee un elevado poder antioxidante *in vitro*, y así los aceites con mayores proporciones de aceite de chía y γ-tocoferol presenten un comportamiento similar a los que contienen un mayor tenor de aceite de girasol (Tabla1).

Durante el almacenamiento a 20±2ºC, el límite máximo legislado fue alcanzado entre 120 y 240 días de almacenamiento en el siguiente orden: aceites mezcla control (120 días), con agregado de ER (150 días), AP (180 días para 90:10, 210 días en girasol-chía 80:20), AP:ER a partir de 240 días en ambos aceites mezcla (Figura 2b). El PV correspondiente a los aceites mezcla 80:20 y 90:10 con agregado de AP:ER fueron los que registraron el menor aumento de este parámetro al cabo de 360 días de almacenamiento, resultando ser la mezcla de antioxidantes más eficiente para retardar la formación de hidroperóxidos a temperatura ambiente.

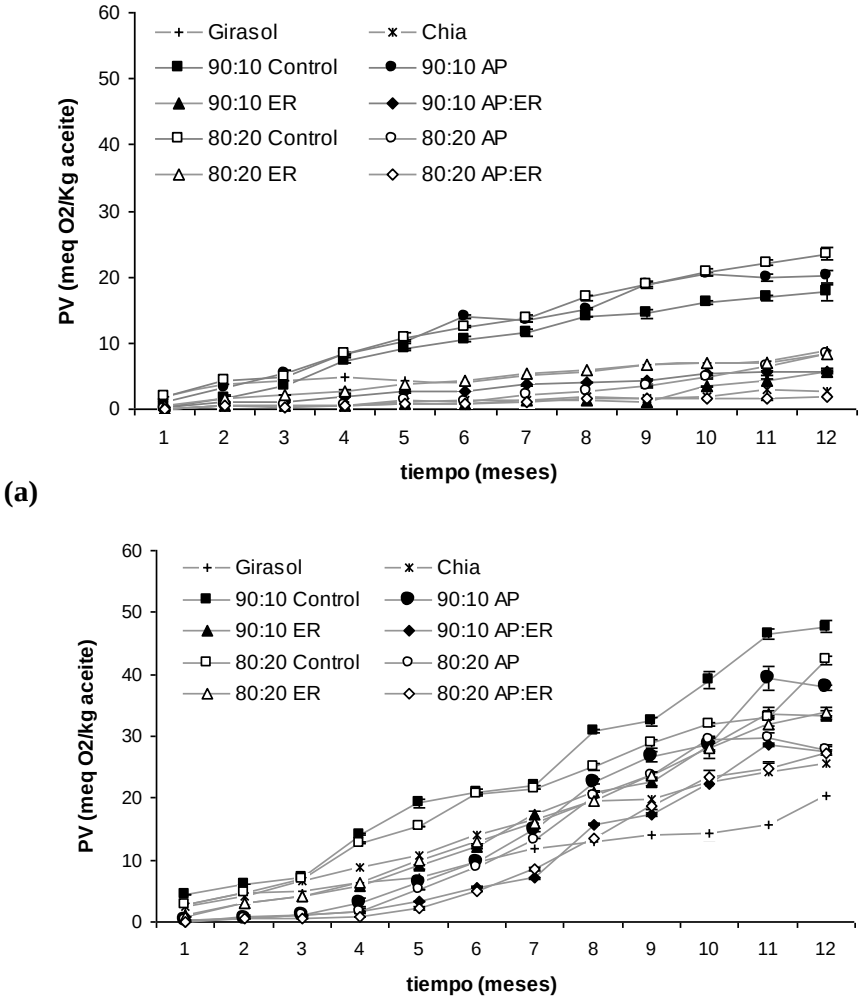
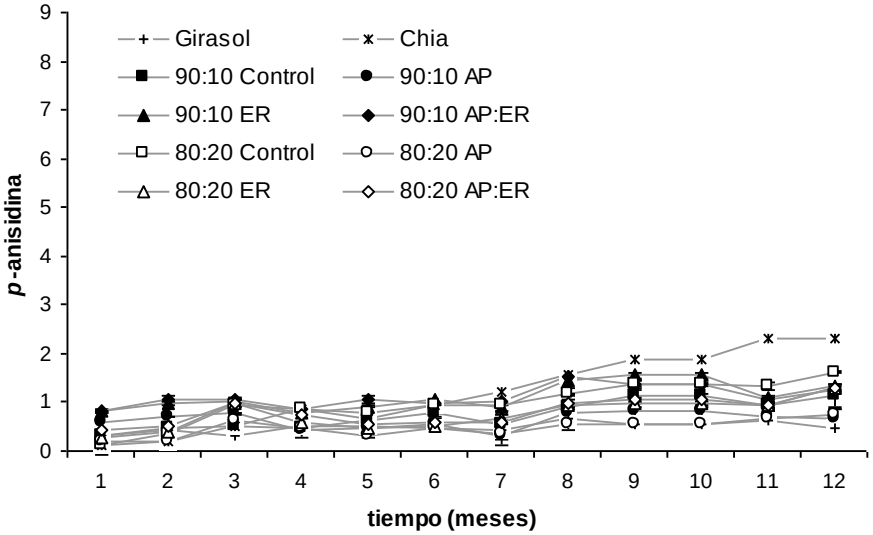


Figura 2. Evolución del índice de peróxido durante el almacenamiento de aceite de chía **(a)** T=4±1ºC, **(b)** T=20±2ºC. Valores promedio de dos lotes independientes (n = 2); las barras verticales indican la desviación estándar

Con respecto al índice de *p*-AV, en la etapa inicial del almacenamiento el aceite de girasol presentó el mayor valor (*p*-AV: 5,25), mientras que el menor valor estuvo asociado al aceite de chía (*p*-AV: 0,70), presentando los aceites mezcla valores intermedios según el porcentaje de cada aceite. Resultados previos (Grompone 1991) han demostrado que el periodo de inducción depende notoriamente del *p*-AV del aceite de partida.
Los valores de *p*-AV se mantuvieron en niveles bajos durante el almacenamiento a 4±1ºC (Figura 3a), mientras que a T=20±2ºC todos los sistemas ensayados presentaron aumentos considerables de este parámetro. El aceite de chía evidenció la mayor formación de los productos secundarios de oxidación para ambas temperaturas de almacenamiento, lo cual puede deberse a su elevado contenido de PUFAs. Por otra parte, los aceites mezcla girasol-chía 90:10 y 80:20 con AP:ER registraron los menores *p*-AV para ambas temperaturas estudiadas. Las mezclas girasol-chía control presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre sí, registrando las mezclas 80:20 una menor formación de compuestos secundarios de oxidación.
La evolución del valor Totox brinda una información útil con respecto al progreso de la formación de los productos primarios y secundarios de la oxidación. Este parámetro mostró una tendencia similar a la observada para el PV, presentando los aceites mezcla control y el aceite de chía a 4±1ºC los mayores valores

de oxidación total (Figura 4a). Estas diferencias estarían asociadas principalmente a la formación de los productos primarios de oxidación (hidroperóxidos), determinada a través del PV.
La oxidación total de los aceites mezcla almacenados a 4±1ºC con agregado de antioxidantes presentaron niveles Totox < 25,0; las mezclas girasol-chía control y el aceite de chía mostraron elevados valores de este parámetro a dicha temperatura. En contraste, a 20±2ºC todos los aceites estudiados mostraron altos niveles de oxidación total alcanzando niveles de 63,0 hasta 85,0. Los resultados obtenidos reflejan la influencia de la temperatura en la conservación de los aceites mezcla girasol-chía.

(a)



(b)

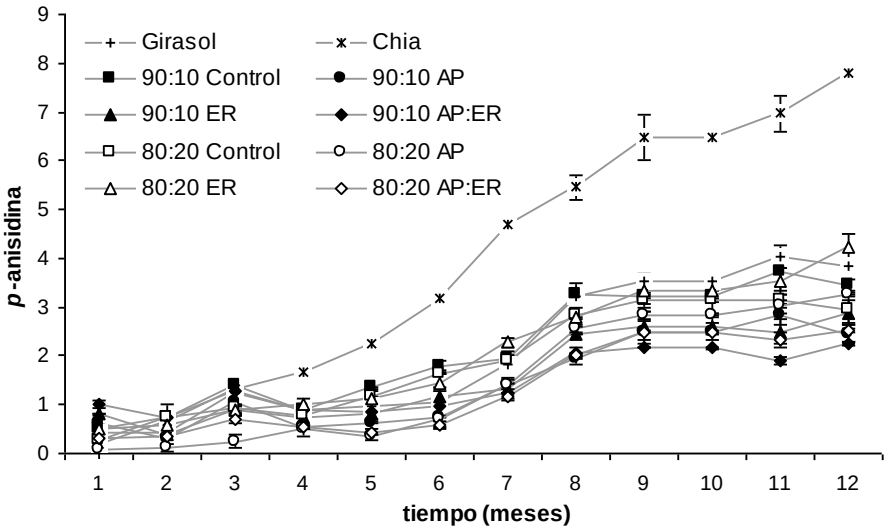
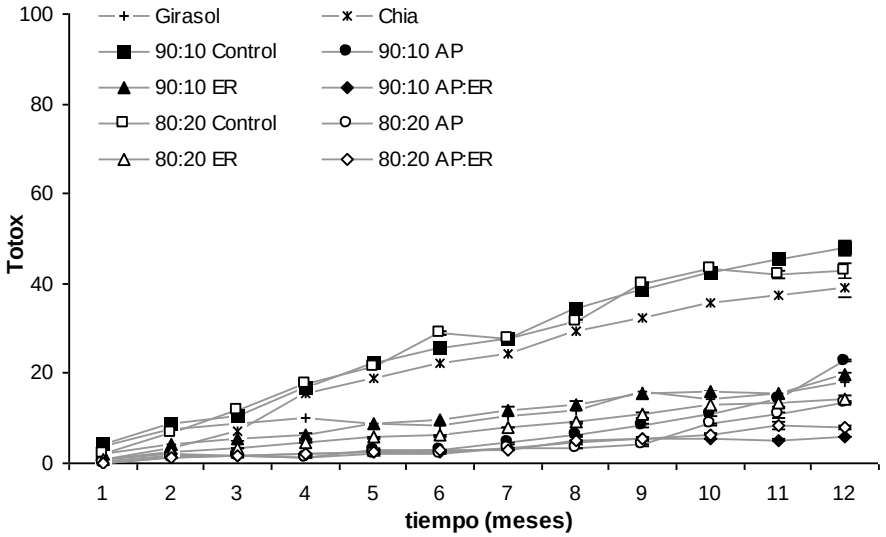


Figura 3. Evolución del valor de *p*-anisidina durante el almacenamiento de aceite de chía **(a)** T=4±1ºC, **(b)** T=20±2ºC. Valores promedio de dos lotes independientes (n = 2); las barras verticales indican la desviación estándar.

(a)



(b)

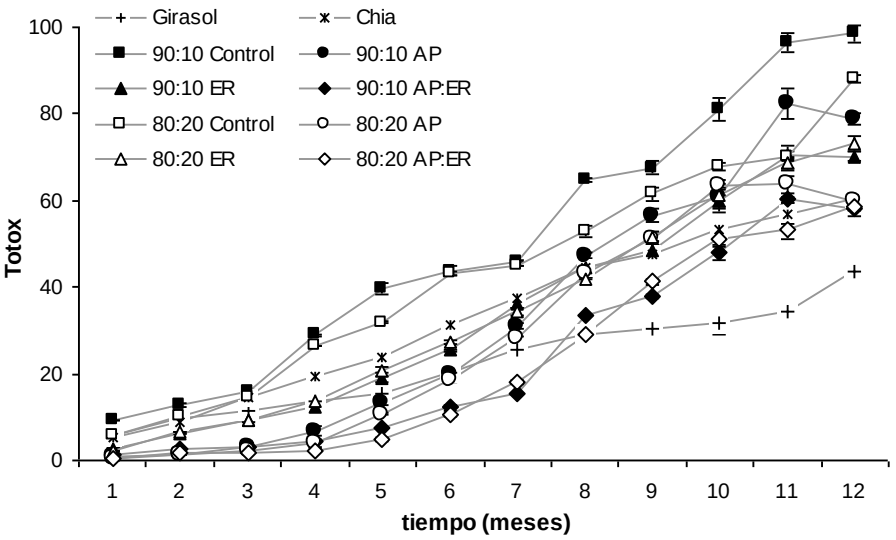


Figura 4. Evolución del valor Totox durante el almacenamiento de aceite de chía (a) T=4±1ºC, (b) T=20±2ºC. Valores promedio de dos lotes independientes (n = 2); las barras verticales indican la desviación estándar

CONCLUSIONES

La composición de ácidos grasos correspondiente a los aceites mezcla girasol-chía, indica que puede lograrse una óptima relación de ácidos grasos ω-6/ω-3 incorporando al aceite de girasol una proporción baja de aceite de chía (10 y 20%). El ensayo de almacenamiento evidenció la importancia de la temperatura de almacenamiento en la evolución del proceso oxidativo. Así, los PV de los aceites mezclas almacenados a 4±1ºC con o sin la adición de antioxidantes registraron menores valores de PV que el límite legal de 10 meq O_2/kg de aceite. En contraste, todas las muestras almacenadas a 20±2ºC alcanzaron el límite máximo legal entre los 120 y 240 días. El tiempo de almacenamiento y la adición de antioxidantes también influyeron en la estabilidad oxidativa, resultando la mezcla de antioxidantes AP:ER la más eficiente para la conservación de los aceites mezcla estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

AOCS 1998. Official methods and recommended practices of the AOCS, 5th edn. Champaign, AOCS Press,
Ayerza R (Jr). 1995. Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina. Journal of the American Oil Chemists´ Society, 72: 1079-1081.
FAO/OMS. Organización Mundial de la Salud. 1997. Las grasas y aceite en la nutrición humana. Informe de una consulta de expertos. Roma, Italia. ISBN 92-5-303621-4
http://www.fao.org/docrep/V4700S/v4700s00.htm. (Fecha de acceso: 15/10/2012)
Frankel EN, Huang SW. 1994. Improving the oxidative stability of polyunsaturated vegetable oils by blending with high oleic sunflower oil. Journal of the American Oil Chemists´ Society, 71: 255-259.
Grompone MA.1991. El índice de anisidina como medida del deterioro latente de un material graso. Grasas y Aceites, 2: 8-13.
IUPAC 1992. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivates (7th ed.). Eds. Paquot C, Hautffenne A. International Union of Pure and Applied Chemistry, Blackwell Scientific Publications Inc., Oxford, UK.
Ixtaina VY, Martínez ML, Spotorno V, Maestri DM, Diehl BW, Nolasco SM, Tomás MC. 2011. Characterization of chia (*Salvia hispanica* L.) crude seed oils obtained by pressing and solvent extraction. Journal of Food Composition and Analysis, 24: 166-174.
Ixtaina VY, Nolasco SM, Tomás MC. 2012. Oxidative stability of chia (*Salvia hispanica* L.) Seed oil: effect of antioxidants and storage conditions. Journal of the American Oil Chemists´ Society, 89: 1077-1090.
Ortega-Nieblas M, Robles-Burgueño MR, Vázquez-Moreno L. 2001. Evaluación oxidativa de las mezclas de aceites de leguminosas del desierto de Sonora con aceites de maíz y soja durante su almacenamiento. Grasas y Aceites, 52: 355-362.
Rossell JB. 1983. Measurements of rancidity. En: Allen JC and Hamilton J, editores. Rancidity in Foods. London, UK: Applied science publisher. pag 21-45.
Shahidi F. 1997. Natural antioxidants: an overview. Natural antioxidants. Illinois: AOCS Press. pag 1–11.
Statgraphics Plus Version 4.0. 1999. Statistical Graphic Corporation. Manugistics Inc., Rockville, USA.
Taga SM, Miller EE, Pratt DE. 1984. Chia seed as a source of natural lipid antioxidants. Journal of the American Oil Chemists´ Society, 61: 928-931.
Velasco Varo L, Fernández Martínez JM, Pérez Vich B. 2012. Aceite de girasol con elevada termoestabilidad. Patente Española número 2: 325 516.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Danisco por la provisión de los antioxidantes y a la profesora Carmen M. Mateo por la cuantificación de tocoferoles.
El presente trabajo fue financiado con el apoyo de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT, PICT 1085), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP 1735 CONICET) y la Universidad Nacional de La Plata (11/X502 UNLP).

Películas de almidón de maíz obtenidas por termocompresión: influencia del agregado de nanopartículas de talco sobre su estructura y propiedades

López O.[1,2], Castillo L.[2], López C.[3], Zaritzky N.[1],Villar M.[2], Barbosa S.[2], García M.A.[1]

1: Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, CONICET. La Plata, Argentina.
2: Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI), Departamento de Ingeniería Química, UNS, CONICET. Bahía Blanca, Argentina.
3: Departamento de Ingeniería Química, UNS, CONICET. Bahía Blanca, Argentina.
magarcia@quimica.unlp.edu.ar

Palabras clave: almidón termoplástico, nanopartículas de talco, termocompresión, estructura y propiedades.

Resumen: Se evaluó el efecto de talco sobre la estructura y las propiedades de películas de almidón de maíz termoplástico (TPS). Mezclas de almidón, glicerol, agua y nanopartículas de talco (0, 1, 3 y 5 % p/p) se procesaron en fundido y se obtuvieron películas por termocompresión. Mediante Microscopía Electrónica de Barrido se observó una buena distribución, dispersión y adhesión del relleno. El talco afectó levemente la estructura cristalina de la matriz debido a la inducción de cristales más pequeños y defectuosos. El grado de cristalinidad del TPS no varió con la adición de talco y no se evidenciaron nuevas fases cristalinas. Mediante Calorimetría Diferencial de Barrido se determinó que las temperaturas de inicio y de fusión de la fase cristalina del TPS disminuyeron con el talco. Todas las películas presentaron capacidad de absorción de radiación UV y su opacidad aumentó con el contenido de talco. El relleno modificó la luminosidad y el color de las películas. Los nanocompuestos TPS-talco presentaron mayor módulo elástico debido a la rigidez de las partículas mientras que su elongación a la ruptura no varió significativamente. Las películas con nanopartículas presentaron menores valores de permeabilidad al vapor de agua debido a la disposición de la carga.

Keywords: thermoplastic starch, talc nanoparticles, thermocompression, structure and properties.

Abstract: Talc influence on thermoplastic starch (TPS) films structure and properties was evaluated. Mixtures of corn starch, glycerol, water and talc nanoparticles (0, 1, 3 and 5% w/w) were melt-processed and films were obtained by thermocompression. By Scanning Electron Microscopy it was observed a good distribution, dispersion and adhesion of the filler to the matrix. Talc affected slightly TPS crystalline structure due to the induction of smaller and more imperfect crystals. Crystallinity degree of TPS matrix was not affected by talc addition and there was no evidence of new crystalline phases. From Differential Scanning Calorimetry assays it was determined that onset and melting temperatures of TPS crystalline phase decreased with talc addition. All films showed UV radiation absorption capacity and their opacity values increased with talc content. The filler incorporation modified films luminosity and their color. The nanocomposites TPS-talc presented higher elastic modulus values compared with TPS films due to the particles rigidity, while their elongation at break did not change significantly. Films with talc showed lower values of water vapor permeability due to the filler disposition within TPS matrix.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los materiales empleados para el envasado de alimentos no son biodegradables, ocasionando un serio problema ambiental. Actualmente, el interés en el desarrollo de biomateriales para este fin permitiría extender la vida útil y mejorar la calidad de los alimentos, reduciendo el impacto ambiental. Se ha reportado el uso de almidones de diferentes fuentes como materia prima para el desarrollo de películas y recubrimientos biodegradables, demostrando así la potencialidad de este carbohidrato en este campo de aplicación (López *et al.* 2010, Müller *et al.* 2009). Cuando el almidón nativo es procesado a altas temperaturas y elevados esfuerzos de corte, su estructura granular se destruye, convirtiéndose así en almidón termoplástico (TPS). Este material presenta la ventaja de que puede ser procesado empleando la tecnología desarrollada para polímeros sintéticos tales como extrusión y soplado, moldeo por termocompresión o por inyección. Debido a la naturaleza hidrofílica del almidón, los materiales a base de TPS presentan ciertas limitaciones relacionadas con el desempeño mecánico y la permeabilidad al vapor de agua. Con el propósito

de mejorar las propiedades mecánicas y de barrera de estas películas se está estudiando la incorporación de diferentes rellenos naturales o minerales (Müller *et al*. 2009, Wilhem *et al.* 2003). Por otra parte, el empleo de materiales de relleno modifica también las propiedades ópticas de las películas así como la morfología de las mismas, condicionando las aplicaciones finales.
El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto de la adición de nanopartículas de talco sobre la morfología, las propiedades térmicas, ópticas, de barrera al vapor de agua y mecánicas de películas de almidón de maíz termoplástico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos utilizados

Se utilizó almidón de maíz (Arcor, Argentina) y glicerol (Anedra). Las nanopartículas de talco fueron provistas por la empresa Dolomita SAIC (Argentina).

Preparación de las mezclas

Se procesaron mezclas de almidón de maíz, glicerol (30 %), agua (45 %) y nanopartículas de talco (0; 1,7; 5,2 y 15,7 %). La composición se expresó en porcentaje de almidón, lo que implica que se usó 1, 3 y 5 % p/p de talco respecto de la mezcla TPS. Los compuestos se procesaron en fundido en una mezcladora batch (Brabender Plastograph) durante 15 min, a 140 ºC y 50 rpm. Las mezclas procesadas se trituraron y acondicionaron a 25 ºC y una humedad relativa (HR) del 60 %.

Obtención de las películas

Las películas se obtuvieron por moldeo por compresión en una prensa hidráulica, empleando una relación de moldeo de 3 $g_{muestra}/cm^3$. Las mezclas se prensaron a 140 ºC y 150 Kg/cm^2 durante 6 min. Las películas se enfriaron bajo presión y luego se retiraron de los moldes. Posteriormente, fueron acondicionadas a 25 ºC y 60 % HR.

Caracterización de las películas

La distribución y dispersión de las nanopartículas de talco en la matriz de TPS se estudiaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), evaluándose además la homogeneidad y apariencia de las películas desarrolladas. Por otra parte, se realizó un análisis elemental cuali y cuantitativo. Se empleó un microscopio electrónico JEOL JSM-35 CF, con detector de electrones secundarios y acoplado al sistema de microanálisis EDAX 2000. Las películas fueron criofracturadas por inmersión en nitrógeno líquido. Las muestras se montaron en tacos de bronce y se recubrieron con una capa de oro (300 Å), utilizando un metalizador por plasma de Argón (sputter coater PELCO 91000). De esta manera, fue posible la visualización tanto de las superficies como de las secciones transversales de las películas.
La identificación de la estructura cristalina y el grado de cristalinidad de las mezclas de TPS-talco fueron estudiadas por Difracción de Rayos X (XRD). Los difractogramas de las películas acondicionadas se obtuvieron usando un difractómetro Philips PW1710, provisto de un tubo y ánodo de cobre, operando a 45 KV, 30 mA y 2θ variando desde 3 hasta 60°. El grado de cristalinidad (GC) se calculó como la relación entre las áreas de los picos de absorción del TPS (sin considerar los correspondientes al talco) y el área total del difractograma, expresado como porcentaje (%). A partir de los valores obtenidos del espaciado entre las láminas de talco (calculado según la ecuación de Bragg), se estimó el grado de exfoliación de las mismas en la matriz de TPS (Mbey *et al.* 2012).
Las propiedades térmicas de las películas se determinaron usando Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Se empleó un calorímetro Perkin Elmer Pyris I. Aproximadamente 10 mg de película previamente acondicionada, fueron pesados en cápsulas herméticas para evitar la pérdida de agua. Una cápsula vacía se usó como referencia. Las muestras fueron calentadas desde 20 a 250 ºC a una velocidad de 10 ºC/min, bajo atmósfera de nitrógeno. A partir de los termogramas obtenidos, se determinaron los siguientes parámetros térmicos: temperatura de inicio (T_o), temperatura de fusión (T_f) y entalpía de fusión (ΔH_f).
Las propiedades de barrera a la luz UV y la opacidad de las películas desarrolladas se determinaron por Espectroscopía UV-vis. Para ello se obtuvieron los espectros de absorción entre 200 y 700 nm en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-160A. La opacidad de las películas se calculó a partir del área de integración bajo la curva registrada entre 400 y 700 nm y se expresó en unidades de absorbancia por nanómetros (AU x nm). El efecto bloqueante de las nanopartículas se calculó mediante la ecuación propuesta por Sanchez-García *et al.* (2010):

$$\text{Efecto bloqueante} = (T_{control}-T_{compuesto})/m_f$$

donde $T_{control}$ y $T_{compuesto}$ corresponden al porcentaje de transmitancia de las películas de TPS y TPS con talco, respectivamente y m_f es el porcentaje de talco con respecto a la masa de almidón en la formulación. El efecto bloqueante se calculó para tres longitudes de onda: 300 nm, 350 nm y 750 nm en las zonas UV-B, UV-A y visible respectivamente (Mbey 2012).

Las medidas de color de las películas se realizaron en un colorímetro Hunterlab UltraScan XE. Se registraron las coordenadas *L*, *a* y *b* de la escala Hunter. En este sistema, el parámetro *a* representa la variación rojo-verde, *b* la variación amarillo-azul, mientras que *L* (luminosidad) varía entre 0, para el negro mate y 100 para el blanco.

El desempeño mecánico se estudió a partir de ensayos de tracción realizados en una máquina universal Instron 3369 a 25 ºC. De cada muestra se ensayaron al menos 10 probetas rectangulares de 13 x 100 mm. Las películas se acondicionaron previamente hasta alcanzar el equilibrio. Se registraron las curvas tensión-deformación y a partir de las mismas se calculó el módulo elástico (E), el esfuerzo de tensión máximo (σ) y la elongación a la ruptura (ε).

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas se midió usando el método del disecante según la norma ASTM E96 (1995). Las determinaciones se realizaron a 25 ºC empleando un gradiente de humedad relativa del 75 %. Las medidas se realizaron al menos por duplicado y el valor reportado corresponde al promedio de las mismas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las micrografías SEM de las superficies de fractura de las películas de TPS se presentan en la Figura 1. En el caso de la formulación de TPS sin talco, la apariencia homogénea en toda la sección transversal indicó la efectividad del proceso de termocompresión debido a la ausencia de gránulos de almidón (Figura 1A). Las películas obtenidas resultaron transparentes, siendo esta propiedad útil para el desarrollo de envases para alimentos donde se requiera que el producto sea visible. La pérdida de glicerol durante el procesamiento de las mezclas resultó despreciable, ya que la temperatura se mantuvo por debajo del punto de ebullición del plastificante. Además, en todas las formulaciones no se observó migración de glicerol luego del mezclado.

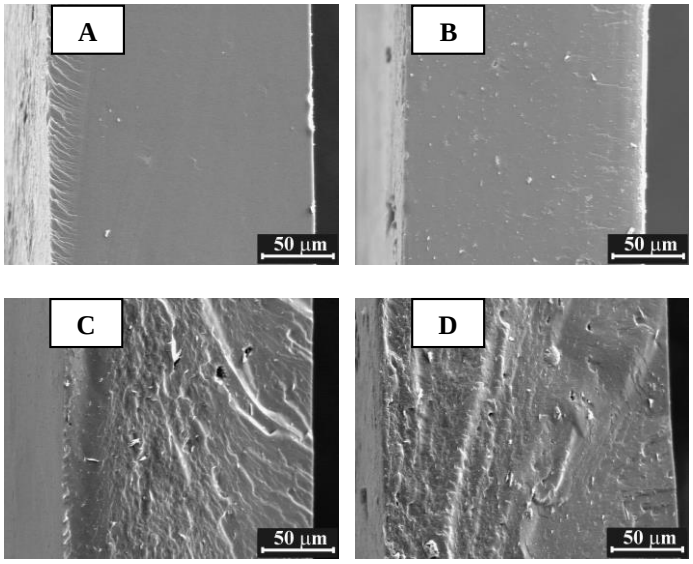


Figura 1. Micrografías SEM (540x) de películas de TPS con A) 0, B) 1, C) 3 y D) 5 % p/p de talco.

Por otra parte, las películas obtenidas a partir de las formulaciones de TPS con talco resultaron homogéneas con una buena distribución y dispersión de las partículas en la matriz (Figuras 1B, 1C y 1D). Una dispersión uniforme de nanopartículas favorece el desarrollo de un gran área superficial matriz-relleno, lo que modifica la movilidad de las cadenas poliméricas, el comportamiento de relajación y consecuentemente las propiedades térmicas y mecánicas del material (Azeredo 2009). No se observaron agregados de partículas en las micrografías SEM, evidenciando a esta escala, una dispersión uniforme del relleno en la matriz. Una

adecuada adhesión en la interfase talco-TPS muestra una buena compatibilidad entre las partículas y la matriz, a pesar de utilizar nanopartículas sin modificar superficialmente. Se observó una orientación preferencial del relleno en la matriz para todas las concentraciones, atribuyéndose a la morfología laminar de las partículas que favorece la alineación de las mismas durante la termocompresión. Por otra parte, la incorporación de talco modificó la superficie de fractura de las películas, incrementando la irregularidad con el aumento de la concentración de partículas (Figuras 1B, 1C y 1D). Este resultado es esperable debido a que la adición de talco al TPS incrementa la cantidad de fase rígida en estos materiales.

La Figura 2 muestra los espectros EDS del TPS, talco, como así también de los nanocompuestos con 1% p/p de relleno. Para el espectro del TPS (Figura 2A), se detectó la presencia de picos de C y O. En la muestra de talco, se observaron los elementos Si, Mg y O (Figura 2B). Para el nanocompuesto, se evidenció la presencia de las partículas de talco debido a que se identificaron los elementos constituyentes del relleno, como así también los correspondientes a la matriz de TPS (Figura 2C). El perfil de Si en el nanocompuesto se determinó por un espectro EDS de línea. Puede observarse que la concentración de este elemento aumentó al detectar una partícula de talco en la matriz de TPS (Figura 2C).

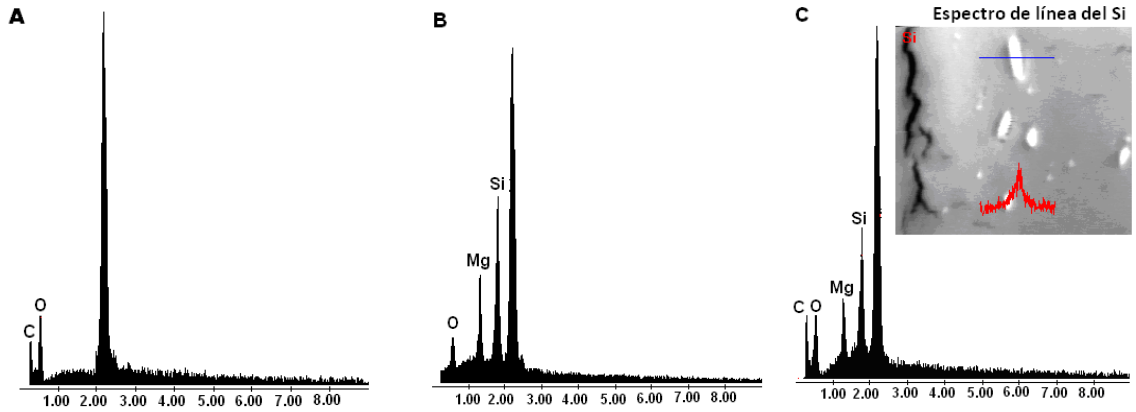


Figura 2. Espectros EDS de A) TPS, B) talco y C) TPS con 1 % p/p de talco junto con el espectro de línea de Si.

A partir de los espectros XRD pudo obtenerse información cualitativa acerca de la orientación y la forma de los cristales. La Figura 3 muestra los difractogramas del talco puro, de las películas de TPS y de los nanocompuestos. El talco exhibe una estructura cristalina, con reflexiones (00l) bien definidas, tal como se muestra en la Figura 3. El espectro de TPS presenta picos anchos y de baja intensidad y una gran zona de contribución amorfa. Estas características corresponden a un polímero semicristalino con una baja cristalinidad (Figura 3). Los principales picos que contribuyen a la cristalinidad del TPS se detectan a 12.8 y 19.6º (Shi *et al.*, 2007) reportaron que los picos agudos en 13.5 y 20.9º para el almidón termoplástico corresponden a la estructura tipo V. Esta estructura cristalina está formada por la cristalización de amilosa en hélices simples involucrando al glicerol o lípidos. Puede dividirse en dos subtipos: V_a (anhidra) con picos en 13.2° y 20.6° y V_h (hidratada) con picos en 12.6 y 19.4° (Corradini *et al.* 2007). Yang *et al.* (2006) encontraron que la cristalinidad V_h se debe a que la fuerte interacción entre los grupos hidroxilos de las moléculas de almidón es sustituida por uniones puente hidrógeno formadas entre el plastificante y el almidón durante el procesamiento. Además, la ausencia de los picos correspondientes a la estructura cristalina tipo A (característica de los almidones provenientes de cereales) es una clara evidencia de que los gránulos de almidón nativo fueron destruidos durante el procesamiento (Bader y Göritz 1994, López *et al.* 2010).

En los difractogramas de las películas de TPS-talco, pueden detectarse los picos correspondientes al talco y al TPS (Figura 3). La estructura cristalina de las películas de los compuestos es similar a la de la matriz. Sin embargo, una pequeña disminución en la intensidad y ensanchamiento de los picos correspondientes a los de TPS se observaron en los difractogramas de los compuestos. Este cambio fue más notorio a bajos ángulos, especialmente en los picos localizados en 12 y 19º, y para la formulación con 5% p/p de talco. Ungar (2004) reportó que el ensanchamiento de los picos de XRD está relacionado con la presencia de cristales imperfectos. De acuerdo a la teoría de dispersión cinemática, el ensanchamiento de los picos se debe a cristales muy pequeños o a la presencia de una gran cantidad de defectos en los mismos. A pesar de los cambios observados en el espectro del TPS, la adición de las nanopartículas no modificó el grado de

cristalinidad de la matriz (Figura 3). Como era esperable, la intensidad de los picos de talco se incrementó con el aumento de la concentración de partículas.

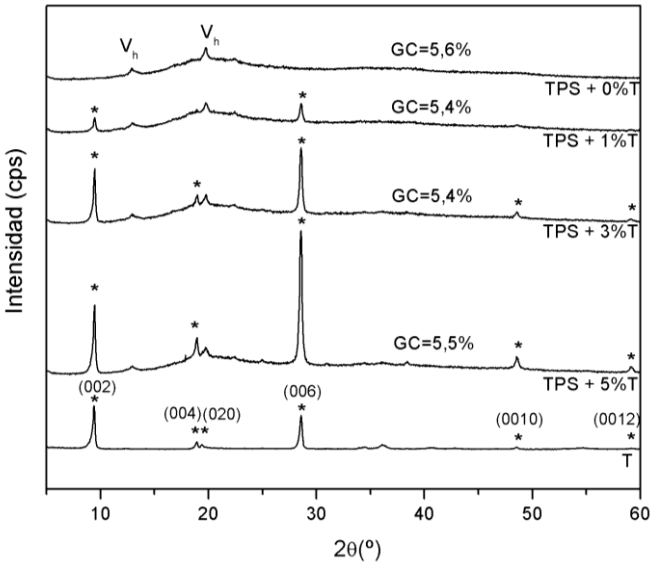


Figura 3. Espectros XRD de talco y de películas de TPS con 0, 1, 3 y 5 % p/p de talco (T).

Para las películas compuestas, la posición 2θ de los picos (00l) de talco es similar a la del espectro del talco (Tabla 1). Como consecuencia, no se registraron cambios en el espaciado de las láminas de talco, aún para las películas con menor contenido (1 % p/p). La modificación superficial del talco podría ser una alternativa para favorecer la exfoliación de las láminas. Otra alternativa para permitir la intercalación y la exfoliación de las partículas en los compuestos TPS-talco sería modificar la forma de preparación de las mezclas (Pandey y Singh 2004).

En los difractogramas de los compuestos TPS-talco, se detectaron picos agudos de talco (00l), evidenciando la alineación de las nanopartículas debido al proceso de termocompresión, previamente observado por SEM (Figura 1). Esto conduce al desarrollo de una estructura ordenada dentro del compuesto. Chen y Evans (2005), estudiando películas de TPS con diferentes arcillas, informaron resultados similares. Por otra parte, McGlashan y Halley (2003) trabajando con películas de compuestos de almidón reportaron que los picos (00l) de la arcilla aparecen más agudos con el incremento de la cantidad de glicerol incorporada.

Tabla 1. Espaciado basal (*d*) de las láminas de talco (T) en las películas de TPS.

Formulación	2 θ (˚)	*d* (Å)
TPS + 1 % T	9,49	9,32
	18,96	4,68
	19,73	4,50
	28,60	3,12
	48,60	1,87
TPS + 3 % T	9,48	9,33
	18,97	4,68
	19,87	4,49
	28,58	3,12
	48,58	1,87
TPS + 5 % T	9,47	9,34
	18,94	4,69
	19,77	4,49
	28,57	3,12
	48,56	1,87

El análisis de las propiedades térmicas por DSC es importante ya que permite determinar el rango de temperatura de procesamiento de los compuestos TPS-talco. Todas las películas obtenidas presentaron una única transición endotérmica, correspondiente a la fusión de la fase cristalina de la matriz. Los parámetros térmicos del TPS y de los nanocompuestos se muestran en la Tabla 2. Los valores de T_o de las películas TPS-talco conteniendo 3 y 5 % p/p resultaron menores que los del TPS. Respecto de la temperatura de fusión, se observó un desplazamiento a menores valores con la incorporación de talco. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos mediante XRD y pueden atribuirse a la presencia de cristales de TPS más pequeños e irregulares en los materiales nanocompuestos. Los valores de la entalpía de fusión presentaron una gran dispersión (Tabla 2), probablemente asociada a la presencia de dos nano-dominios (fase rica en glicerol y fase rica en almidón). A pesar de la dispersión, no se observaron diferencias significativas entre los valores de la entalpía. Esto concuerda con que el grado de cristalinidad de la matriz de TPS no varía con la incorporación de talco, determinada previamente por XRD (Figura 3).

Tabla 2. Propiedades térmicas de películas TPS con talco (T).

Formulación	T_o (ºC)	T_f (ºC)	ΔH_f (J/g TPS)
TPS + 0 % T	133,1±1,3^{a}	156,4±2,1^{a}	140,7±32,2^{a}
TPS + 1 % T	129,3±3,6^{a,b}	148,2±3,2^{b}	138,0±20,2^{a}
TPS + 3 % T	128,7±2,6^{b}	146,0±2,9^{b}	131,2±9,2^{a}
TPS + 5 % T	127,8±3,1^{b}	144,3±0,8^{b}	115,8±17,3^{a}

Los valores reportados corresponden al promedio ± desviación estándar. Los valores dentro de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes entre sí ($p<0,05$).

La evaluación de las propiedades ópticas de las películas es relevante ya que las mismas restringen la aplicación de estos materiales, principalmente en el desarrollo de envases. La Figura 4 muestra las fotografías de las películas obtenidas a partir de las formulaciones estudiadas. No se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre los espesores de las muestras, variando entre 196 y 214 μm. El moldeo por termocompresión permitió obtener películas con espesor controlado, siendo este parámetro muy importante en el estudio de la estructura de las mismas y en el análisis de su relación con las propiedades de estos materiales.

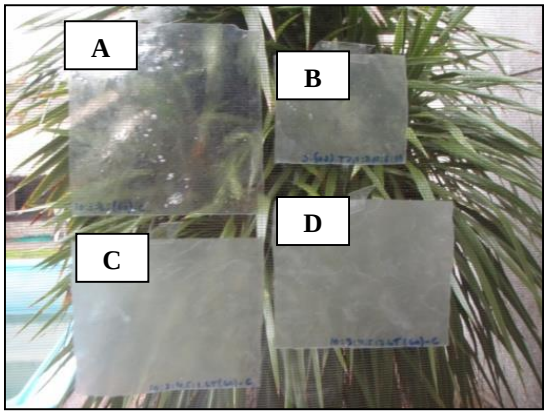


Figura 4. Fotografías de películas de TPS con: A) 0, B) 1, C) 3 y D) 5 % p/p de talco.

Los parámetros de color de las películas se presentan en la Tabla 3. Las nanopartículas de talco modificaron la luminosidad (*L*), como así también, los parámetros de cromaticidad (*a* y *b*) de las películas de TPS. La adición de talco en una concentración superior a 3 % p/p disminuyó significativamente ($p<0,05$) la luminosidad de las películas. Además, los materiales con nanopartículas presentaron menores valores ($p<0,05$) del parámetro *a* (rojo-verde), mientras que el *b* (amarillo-azul) resultó significativamente mayor, comparados con los correspondientes a las películas de TPS. Los valores de diferencia de color (ΔE), parámetro que muestra los efectos combinados de *L*, *a* y *b*, también se incluyen en la Tabla 3. La adición de 3 % p/p de nanopartículas de talco a la matriz de TPS modificó significativamente ($p<0,05$) los valores de ΔE de las películas desarrolladas.

Tabla 3. Parámetros de color y opacidad de películas de TPS con talco (T).

Formulación	Parámetros de color				Opacidad (AU x nm)
	L (luminosidad)	*a* (rojo-verde)	*b* (amarillo-azul)	*ΔE*	
TPS + 0 % T	85,4±0,2[a]	8,00±0,02[a]	1,6±0,1[a]	85,8±0,2[a]	31,8±6,4[a]
TPS + 1 % T	85,0±0,4[a,b]	7,88±0,06[b]	2,1±0,3[b]	85,4±0,5[a,b]	54,5±6,7[b]
TPS + 3 % T	84,5±0,4[b]	7,88±0,05[b]	2,4±0,3[b]	84,9±0,5[b]	71,6±2,1[c]
TPS + 5 % T	83,1±0,5[c]	7,83±0,05[b]	4,3±0,4[c]	83,6±0,6[c]	109,0±9,3[d]

Los valores reportados corresponden al promedio ± desviación estándar. Los valores dentro de una misma columna seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes entre sí (p<0,05).

La Figura 5A corresponde a los espectros UV-vis de las películas de TPS con todas las concentraciones de talco ensayadas. Las películas capaces de absorber en la zona UV podrían ser útiles para desarrollar envases y extender la vida útil de alimentos susceptibles a la rancidez oxidativa catalizada por radiación UV. En cambio, las películas que no absorben en esta región espectral, podrían utilizarse para envasar alimentos que luego serán sanitizados por exposición a luz UV y disminuir así la carga microbiana. Los espectros que se muestran en la Figura 5A presentan un pico de absorción localizado entre 270 y 300 nm, indicando que las nanopartículas de talco no afectaron la capacidad de absorción de radiación UV de las películas de TPS. Además, este estudio permitió analizar la dispersión de la carga en la matriz y obtener información adicional sobre el efecto bloqueante del talco a la radiación UV y visible. El efecto bloqueante en función de la concentración de talco se muestra en la Figura 5B. Un incremento en la concentración de talco de 1 a 3 % p/p permitió una reducción significativa de la transmisión de la radiación UV, como así también, de la luz visible. La adición de talco redujo la transmitancia, de acuerdo con el incremento del desarrollo de color observado. Una tendencia similar fue informada por Mbey *et al.* (2012) para películas a base de almidón de mandioca y kaolinita.

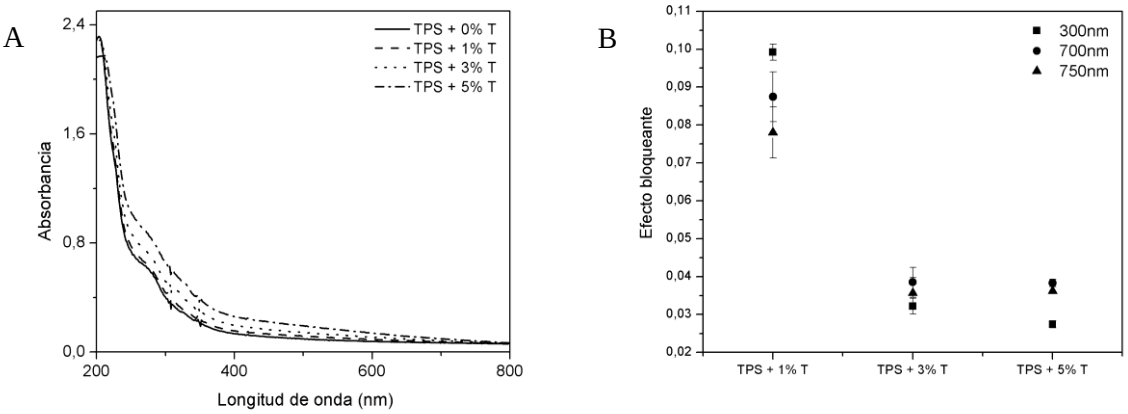


Figura 5. A) Espectro de absorción (200-700 nm) de películas de TPS con 0, 1, 3 y 5 % p/p de talco (T), B) Efecto bloqueante.

La Tabla 3 muestra los valores de opacidad de los nanocompuestos calculados a partir de la región visible de los espectros de absorción (Figura 5A). La opacidad de las películas aumentó significativamente (p<0,05) con el incremento de la concentración de talco en las formulaciones. A pesar de este aumento, los valores registrados para las películas de TPS-talco resultaron ser bajos debido a que las láminas de talco presentan espesores nanométricos. Así, cuando estas nanopartículas se dispersan en la matriz polimérica, los nanocompuestos resultan ópticamente transparentes a la luz visible (Sinha Ray y Okamoto 2003).
La influencia de la incorporación de talco sobre el módulo elástico (E) de las películas de TPS se presenta en la Figura 6. La incorporación de hasta 3 % p/p de nanopartículas no afectó la rigidez del material ya que los

valores de E no presentaron diferencias significativas entre sí (p>0,05). Cuando se adicionaron 5 % p/p de talco a las formulaciones, las películas desarrolladas mostraron un incremento en el valor de E debido principalmente a la rigidez del material de relleno. Con respecto a la elongación a la ruptura, se observó que ninguna de las concentraciones de talco empleadas modificó significativamente dicha propiedad, registrándose valores promedios de 67 % aproximadamente.

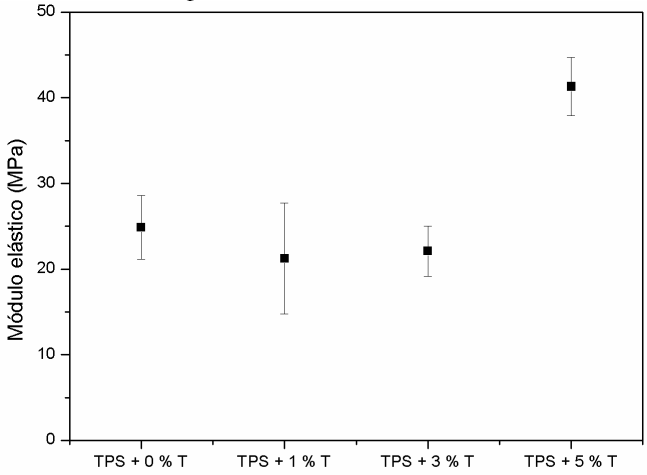


Figura 6. Módulo elástico de películas de TPS con 0, 1, 3 y 5 % p/p de talco (T).

La Figura 7 muestra la permeabilidad al vapor de agua de las películas desarrolladas en función del contenido de talco. La adición de 1% p/p de nanopartículas no influyó notoriamente, debido a que los valores obtenidos se encuentran dentro del error experimental. Sin embargo, a medida que aumentó la concentración de talco en el compuesto, la permeabilidad de las películas disminuyó significativamente (p<0,05). Cuando se adicionó tan sólo 3 % p/p de talco, la permeabilidad disminuyó un 30% respecto del valor para las películas de TPS. Esta tendencia puede explicarse a través de la existencia de caminos difusivos más largos para las moléculas que atraviesan las películas a medida que aumenta la concentración de las nanopartículas. La causa de la reducción de WVP se debe al camino tortuoso que forman las partículas al alinearse dentro de la matriz durante el proceso de termocompresión. Además, la buena dispersión de las partículas favoreció la baja desviación de los valores obtenidos. Esto condice con lo reportado por otros autores (Slavutsky *et al.* 2012).

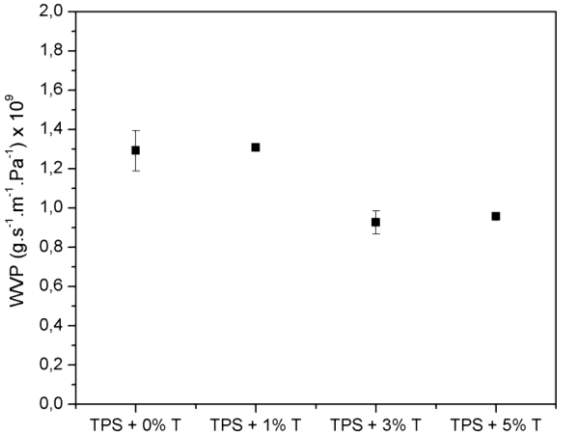


Figura 7. Permeabilidad al vapor de agua de películas de TPS con 0, 1, 3 y 5 % p/p de talco (T).

CONCLUSIÓN

La incorporación de nanopartículas de talco a formulaciones a base de almidón de maíz termoplástico (TPS) permitió desarrollar películas homogéneas, con buena distribución, dispersión y adhesión de la carga en la matriz. Además, se observó una orientación preferencial de las partículas dentro de la matriz debido a la morfología laminar del talco y al proceso de termocompresión. La presencia de talco indujo la formación de

cristales más pequeños e imperfectos afectando así la estructura cristalina de la matriz como así también las temperaturas de inicio y fusión de la fase cristalina del TPS. Las nanopartículas de talco modificaron la luminosidad y el color. La opacidad de las películas aumentó con la adición de talco, mientras que la capacidad de absorción de radiación UV de estos materiales no se vio afectada. Los valores del módulo elástico aumentaron significativamente con la incorporación de 5 % p/p de talco manteniendo la misma elongación a la ruptura que las películas sin el relleno. La disposición de las partículas en la matriz permitió disminuir la permeabilidad al vapor de agua de las películas de TPS. Los resultados obtenidos permiten inferir que las películas desarrolladas tienen un futuro muy promisorio en el envasado de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

American Society for Testing and Materials-ASTM. 1995. Standard test methods for water vapor transmission of material, E96-95. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, PA.

Azeredo H. 2009. Nanocomposites for food packaging applications. Food Research International, 42: 1240-1253.

Bader HG, Göritz D. 1994. Investigation on High Amylose Corn Starch Films. Starch/Stärke, 46(6): 229-232.

Chen B, Evans JRG. 2005. Thermoplastic starch–clay nanocomposites and their characteristics. Carbohydrate Polymers, 61(4): 455-463.

Corradini E, de Morais L, Demarquette N, Agnelli J, Mattoso L. 2007. Study of process parameters for starch, gluten, and glycerol mixtures. Polymers for Advanced Technologies, 18: 861–867.

López O, García M, Zaritzky N. 2010. Physicochemical characterization of chemically modified corn starches related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity. Journal of Food Engineering, 100(1): 160-168.

Mbey JA, Hoppe S, Thomas F. 2012. Cassava starch–kaolinite composite film. Effect of clay content and clay modification on film properties. Carbohydrate Polymers, 88: 213-222.

McGlashan SA, Halley PJ. 2003. Preparation and characterisation of biodegradable starch-based nanocomposite materials. Polymer International, 52(11): 1767–1773.

Müller CM, Laurindo JB, Yamashita F. 2009. Effect of cellulose fibers addtion on the mechanical properties and watervapor barrier of starch-based films. Food Hydrocolloids, 23: 1328-1333.

Pandey JK, Singh RP. 2004. Green nanocomposites from renewable resources: Effect of plasticizer on the structure and material properties of clay-filled starch. Starch-Stärke, 57(1): 8–15.

Sanchez-Garcia MD, Hilliou L, Lagaron J M. 2010. Nanobiocomposites of Carrageenan, Zein, and Mica of Interest in Food Packaging and Coating Applications. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(11): 6884-6894.

Shi R, Liu Q, Ding T, Han Y, Zhang L, Chen D, Tian W. 2007. Ageing of soft thermoplastic starch with high glycerol content. Journal of Applied Polymer Science, 103(1): 574–586.

Sinha Ray S, Okamoto M. 2003. Polymer/layered silicate nanocomposites: A review from preparation to processing. Progress in Polymer Science, 28: 1539–1641.

Slavutsky M, Bertuzzi M, Armada M. 2012. Water barrier properties of starch-clay nanocomposite films. Brazilian Journal of Food Technology, 15(3). http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232012005000014

Ungar T. 2004. Microstructural parameters from X-ray diffraction peak broadening. Scripta Materialia, 51(8): 777–781.

Wilhelm H, Sierakowsk, M, Souza G, Wypych F. 2003. Starch films reinforced with mineral clay. Carbohydrate Polymers, 52: 101–110.

Yang J, Yu J, Ma X. 2006. A Novel Plasticizer for the Preparation of Thermoplastic Starch. Chinese Chemical Letters, 17(1): 133-136.

Cinética de liberación de antioxidantes de yerba mate encapsulados en matrices de almidón-alginato de calcio

López Córdoba A.F., Deladino L, Martino M

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de los Alimentos (CIDCA), CONICET, Fac. Cs. Exactas (UNLP), La Plata, Argentina
alexlcordoba@gmail.com

Resumen: La yerba mate (*Ilex paraguariensis*), constituye una fuente de antioxidantes naturales con vista a la sustitución de compuestos sintético y a su utilización como ingredientes funcionales. Se encapsuló un extracto acuoso de yerba mate en matrices de alginato de calcio con y sin agregado de almidón de maíz como relleno. Las cápsulas fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y porosimetría de intrusión de mercurio. Se estudió la cinética y el mecanismo de liberación de los polifenoles en Fluido Gástrico Simulado (FGS), HCl pH=2. La incorporación de almidón mejoró la eficiencia de encapsulación, disminuyó la porosidad y favoreció la conservación de la morfología de las cápsulas posterior al secado. Mediante DSC se observaron cambios en las propiedades del sistema matriz-relleno y se obtuvieron temperaturas de transición vítrea (Tg) características de sistemas estables a temperatura ambiente. El relleno de almidón moduló la velocidad de liberación en FGS, debido a la habilidad de los gránulos de ocupar los espacios intersticiales de la matriz. El perfil de liberación de los encapsulados se ajustó satisfactoriamente al modelo de Peppas y Sahlin (R^2 = 0,96), indicando un mecanismo de liberación gobernado por el acoplamiento entre fenómenos de difusión e hinchamiento.

Palabras clave: *Ilex paraguariensis*, antioxidantes naturales, encapsulación, liberación.

Abstract: Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) is a source of natural antioxidants, promising as functional ingredient and as substitute of synthetic additives. Aqueous extracts of yerba mate were encapsulated in a calcium alginate matrix, with and without addition of corn starch as filler. The beads were characterized by Scanning Electronic Microscopy (SEM), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and mercury intrusion porosimetry. The kinetic and release mechanism of polyphenols in Simulated Gastric Fluid (SGF), HCl pH=2, were studied. The incorporation of starch as filler improved encapsulation efficiency, decreased porosity and maintained the morphology of beads after drying process. Differences in the relationship between matrix and filler were observed by DSC analysis. Glass transition temperatures (Tg) of both systems were higher than room temperature, what could be associated with a high stability. The starch addition modulated the release rate in SGF, this effect was attributed to the ability of starch granules to fill the interstitials voids in the matrix. The release profile of both type of capsules exhibited a good fitting to Peppas and Sahlin model (R^2 =0.96), showing a release mechanism governed by both swelling and diffusion.

Keywords: *Ilex paraguariensis,* natural antioxidants, encapsulation, release.

INTRODUCCIÓN

La encapsulación ha sido definida como la tecnología mediante la cual se logra confinar compuestos activos dentro de una matriz polimérica. Esta técnica crea un microambiente en la cápsula capaz de controlar las interacciones entre el interior y el exterior (Borgogna *et al.* 2010). De acuerdo a Champagne y Fustier (2007) algunos de los propósitos de aplicar una técnica de encapsulación en la industria de alimentos son: proteger el compuesto activo de la degradación producida por el ambiente, liberación controlada bajo condiciones específicas, modificar las características físicas del material original y hacer más fácil su manipuleo, enmascarar sabores desagradables y separar componentes con el fin de que éstos no reaccionen entre sí. El desarrollo de sistemas de vehiculización y liberación controlada de compuestos activos es una de las estrategias de uso frecuente en la formulación de alimentos con propiedades funcionales. La liberación controlada se define como el mecanismo mediante el cual uno o más compuestos pueden dirigirse a un sitio específico, en un tiempo y velocidad modulada. Los mecanismos más importantes que regulan la velocidad de liberación de un compuesto activo son: difusión, hinchamiento, biodegradación/ erosión y presión osmótica (Mastromatteo *et al.* 2010; Pothakamury y Barbosa-Cánovas 1995). La relevancia de cada uno de ellos dependerá en gran medida de la composición de la matriz polimérica y del medio circundante, por lo

que el agente activo puede ser liberado al medio por uno o por varios mecanismos actuando simultáneamente (Barba *et al.* 2009).

La yerba mate es una planta nativa de la región subtropical de América del Sur, consumida y producida principalmente en Argentina, el sur de Brasil, Uruguay y Paraguay. En estos países se ingiere como bebida en proporciones de más de un litro por día por millones de personas, como mate, mate cocido o tereré. Esta planta contiene una gran variedad de compuestos bioactivos capaces de actuar frente a reacciones de estrés oxidativo, implicadas en el desarrollo de diversas enfermedades (Bracesco *et al.* 2011). Actualmente el uso de antioxidantes naturales es de gran interés para el desarrollo de alimentos con propiedades especiales. Sin embargo, debido a la inestabilidad química y física de estos compuestos su aplicación directa en alimentos es limitada. A través de diferentes técnicas de encapsulación se ha logrado conservar antioxidantes de origen natural como ingrediente funcional activo (Deladino *et al.* 2008; Fang y Bhandari 2010). Los objetivos de este trabajo fueron encapsular un extracto acuoso de yerba mate en matrices de alginato de calcio y almidón-alginato de calcio, estudiar el efecto del agregado de almidón sobre las características morfológicas y analizar el mecanismo y la cinética liberación de los polifenoles en FGS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las cápsulas

Para la obtención de las cápsulas de alginato de calcio se preparó un extracto acuoso de yerba mate al 3 % p/v y se mezcló con alginato de sodio al 2% p/v (Sigma–Aldrich, EE.UU). Las cápsulas con relleno se prepararon adicionando a la solución anterior almidón de maíz comercial (Maizena®) al 2% p/v. Ambos sistemas se obtuvieron mediante gelificación iónica por goteo en una solución de $CaCl_2$ al 0,05 M usando una bomba peristáltica Minipuls 3 (Gilson®, Francia). Los geles permanecieron en la solución de $CaCl_2$ 15 min, se filtraron y fueron lavados con solución buffer acético/acetato pH 5.5 para eliminar el exceso de iones calcio (Deladino *et al.* 2008) y se secaron a 65 °C/ 3 h. Las cápsulas de alginato sin relleno se las denominó SS y a las adicionadas de almidón al 2 %, SC.

La eficiencia de la encapsulación de los antioxidantes de yerba mate se determinó mediante la destrucción de una cantidad conocida de cápsulas con citrato de sodio 5% p/v y la posterior determinación de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteau (Schlesier *et al.* 2002).

Caracterización de las cápsulas

El análisis morfológico de los encapsulados se realizó mediante microscopía SEM en un equipo FEI-Quanta 200 (Holanda). Las muestras se metalizaron con una capa de oro y se examinaron empleando un voltaje de aceleración de 20 kV.

El estudio de las propiedades térmicas se realizó empleando un calorímetro diferencial de barrido (DSC Q100, TA Instruments, E.E.U.U), a una velocidad de 10 °C/min, desde 25 ° hasta 300 °C. Las muestras (3-5 mg) se colocaron en cápsulas de aluminio y se cerraron herméticamente. Como referencia se empleó una cápsula vacía.

La distribución de tamaño de poro en los sistemas encapsulados se analizó mediante porosimetría de intrusión de mercurio (PIM) en un equipo Pascal 440 Thermo Fisher. La presión máxima de Hg aplicada a las muestras fue de 400 MPa. El tratamiento de los datos experimentales fue realizado mediante la ecuación de Washburn (1921).

Cinética de liberación de polifenoles en FGS

Se estudió la liberación de los polifenoles de yerba mate empleando como fluido gástrico simulado HCl 0.1 M, pH 2. Una cantidad conocida de cápsulas se introdujo en un volumen de medio y permanecieron en un agitador orbital (Lab-Line Instruments, EE.UU) a 37º C y 125 rpm durante 4h. Se tomaron alícuotas del sobrenadante a diferentes tiempos. Se cuantificó la fracción de polifenoles liberada a cada tiempo t respecto de la masa inicial de polifenoles encapsulada. La masa inicial de polifenoles se determinó desintegrando la misma cantidad de cápsulas empleadas en el ensayo de liberación en una solución de citrato de sodio (5% p/v). El contenido de polifenoles en todos los casos fue medido mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Por otro lado, para el estudio de la cinética de cambio de masa de las cápsulas durante la inmersión en FGS se llevó a cabo un ensayo equivalente al descripto anteriormente. Se prepararon varios tubos con igual masa de cápsulas y volumen de medio. A diferentes tiempos se seleccionó un tubo al azar, las cápsulas se filtraron, se secaron con papel Whatman Nº 1 y se pesaron. El porcentaje de cambio de masa (% ΔW) fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta W(\%) = \left(\frac{W_t - W_0}{W_0} \right) * 100 \qquad (1)$$

Donde W_t representa la masa (g) de las cápsulas en el tiempo t y W_0 la masa (g) de cápsulas introducidas inicialmente. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado en el software Sigma Plot versión 11.0. Se realizaron análisis de varianza, con un nivel de significancia del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron cápsulas de alginato de calcio conteniendo extracto de yerba mate con una eficiencia de carga del 55%. La incorporación de almidón al 2% p/v mejoró significativamente la capacidad de carga alcanzando valores de eficiencia del 65 %.

Las micrografías SEM obtenidas para las cápsulas de alginato con y sin agregado de almidón se muestran en la **Figura 1.**

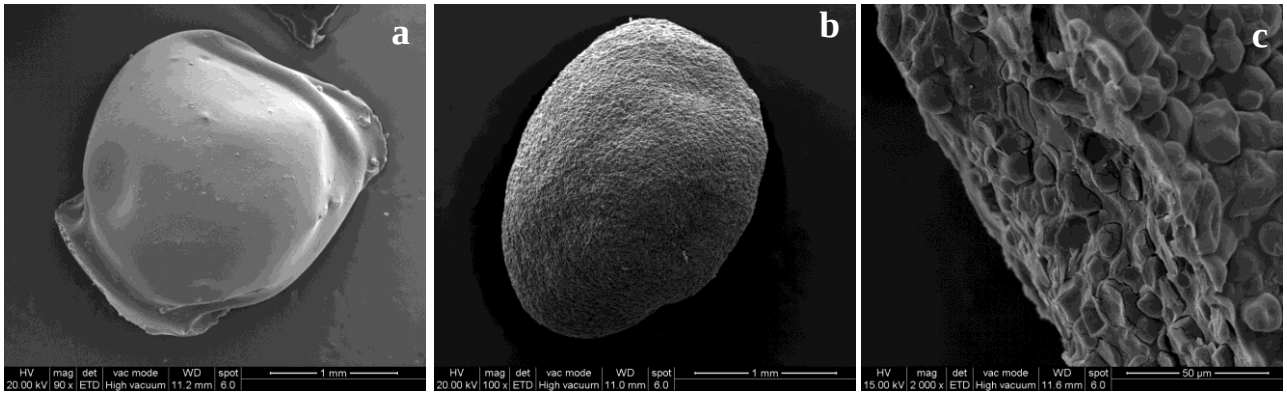


Figura 1: Micrografías SEM para cápsulas de alginato sin (a) y con (b-c) relleno de almidón

Se observó que ambos tipos de cápsulas perdieron cierta esfericidad luego del secado. Dicho efecto fue más notorio en el cápsulas sin relleno, las cuales resultaron más aplanadas e irregulares (**Figura 1a**). Las cápsulas con almidón al 2 % (**Figura 1b-c**), mantuvieron cierto grado de esfericidad, observándose la disposición de los gránulos tanto en el exterior como en el interior de la matriz.

En el análisis de DSC el extracto de yerba mate mostró una única transición endotérmica cercana a los 85 °C. El pico obtenido fue ancho posiblemente debido al efecto sinérgico de los compuestos presentes en el extracto que tienen transiciones en este rango de temperatura. El alginato de sodio mostró un pico exotérmico de descomposición a los 225 °C. Picos similares fueron obtenidos por Anbinder *et al.* (2011) y Sarmento *et al.* (2006) a temperaturas de 240, y 247 °C respectivamente.

En los termogramas de los encapsulados, el pico característico del alginato de sodio no fue observado debido a la formación de la estructura de "caja de huevo" con los iones calcio. Las cápsulas de alginato de calcio sin y con extracto, mostraron endotermas anchas con temperaturas de pico de 194 y 198 °C, respectivamente. Con la inclusión de almidón al sistema, las endotermas se desplazaron hacia temperaturas mayores a valores de 209 y 201 °C para cápsulas sin y con extracto, respectivamente. Este desplazamiento podría atribuirse a cambios en la matriz de alginato de calcio con la adición de almidón.

Se obtuvieron valores de temperatura de transición vítrea de alrededor de 55°C, para ambos tipos de cápsulas, lo que indica de una buena estabilidad de los materiales a temperatura ambiente.

En la **Figura 2** se observa la distribución de tamaño de poro para las cápsulas de alginato con y sin agregado de rellleno.

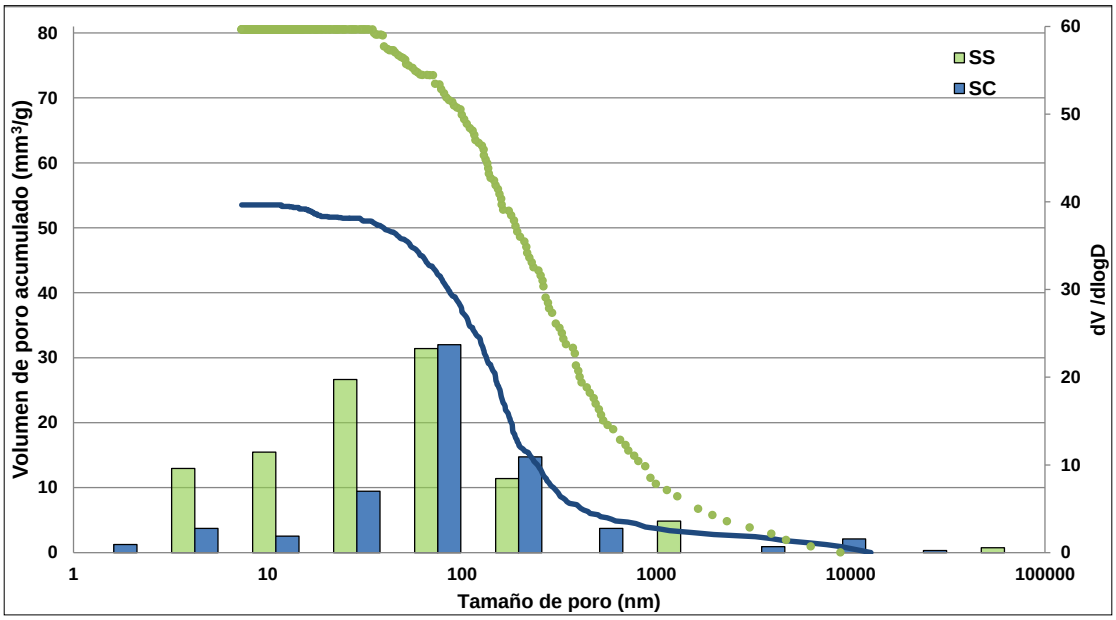


Figura 2. Distribución de tamaños de poro para las cápsulas de alginato sin (SS) y con (SC) agregado de almidón de relleno. Eje principal: Volumen acumulado de poros (Gráfico de líneas), Eje secundario: dV/d Log D (Gráfico de barras).

Se obtuvo un tamaño de poro promedio de 100 nm para ambos sistemas. Las cápsulas de alginato de calcio resultaron más porosas que las que contenían almidón al 2%. El agregado de relleno modificó el perfil de distribución de poros generando una disminución del volumen acumulado de poros, principalmente entre los 5-50 nm. Este comportamiento fue atribuido a la distribución de almidón en el interior de la matriz como se pudo observar en las fotografías SEM (**Figura 1**), el cual dificultaría el ingreso de mercurio en el ensayo debido a que aumenta la tortuosidad del sistema.

La cinética de liberación de polifenoles en FGS para las cápsulas con y sin agregado de relleno se muestra en la **Figura 3**.

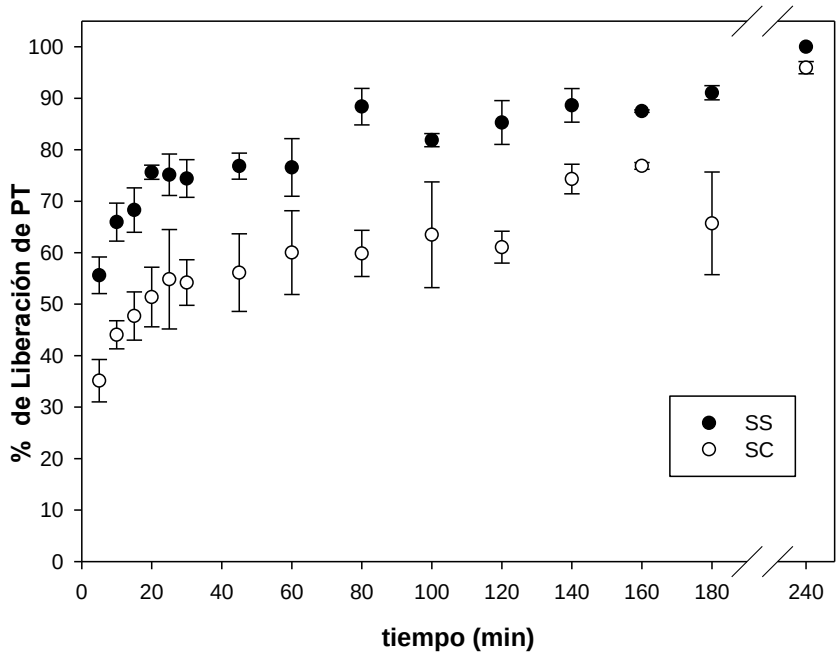


Figura 3. Cinética de liberación de polifenoles en FGS para cápsulas secas SS y SC.

La velocidad de liberación inicial de los encapsulados en FGS fue rápida, liberándose más del 50% de polifenoles totales (PT) en un tiempo de 5 y 25 min para las cápsulas sin y con almidón, respectivamente (**Figura 3**). A tiempos mayores, la cantidad de PT liberada continuó en ascenso pero a menor velocidad, siendo este efecto más notorio en las cápsulas con almidón, el cual moduló sustancialmente la cinética. Los perfiles de liberación de ambas formulaciones secas resultaron significativamente diferentes ($p<0.05$), siendo la velocidad de liberación de PT más lenta en el sistema con almidón adicionado al 2%.
El efecto modulador debido a la incorporación de almidón, puede explicarse teniendo en cuenta el estudio de las características microestructurales discutidas anteriormente. En este sistema, el almidón actúa como material de relleno reforzando la estructura y ocupando parcialmente los espacios internos de la matriz; disminuyendo así la porosidad del sistema. Los gránulos de almidón dispersos en la matriz actúan como barrera al flujo de solvente conduciendo sus moléculas a través de un camino tortuoso, que hace más lenta la liberación de compuesto activo (**Figura 3**). El mismo efecto ha sido observado por otros autores con el agregado de rellenos inertes como bentonita, silicatos, celulosa, entre otros (Gal y Nussinovitch 2007; Puttipipatkhachorn *et al.* 2005; Rassis *et al.* 2002; Sultana *et al.* 2000).

Los perfiles de liberación de polifenoles en FGS de los sistemas encapsulados, se analizaron mediante el ajuste del modelo de Peppas y Sahlin, (1989) (2):

$$\frac{m_t}{m_\infty} = k_d \cdot t^m + k_r \cdot t^{2 \cdot m} \qquad (2)$$

Donde m_t, corresponde a la masa de polifenoles liberada al tiempo t y m_∞ la masa polifenoles inicialmente encapsulada, esta última fue determinada introduciendo la misma cantidad de cápsulas utilizada en el ensayo de liberación, en una solución de citrato de sodio (5% p/v) hasta disolución completa, en el agitador orbital a 37 º C y 125 rpm. La constante k_d, representa la contribución difusional, mientras que el segundo término, k_r, representa la contribución de la relajación del caso II, del modelo de Korsmeyer y Peppas.
Los parámetros del modelo fueron calculados mediante el software DDSolver (Zhang *et al.* 2010). El nivel de ajuste de los datos a cada ecuación, se evaluó tomando como referencia los valores R^2 corregido y la distribución de los residuos entre los valores medidos y los estimados en cada caso.
El modelo de Peppas y Sahlin ajustó satisfactoriamente la cinética de liberación de ambos tipos de cápsulas. Se obtuvo una buena distribución de residuos y un valor de R^2 corregido óptimo (**Tabla 1**). Este modelo tiene en cuenta como mecanismos de liberación predominantes un acoplamiento de la difusión y la relajación macromolecular (Peppas y Sahlin, 1989).

Tabla 1. Parámetros cinéticos obtenidos para cápsulas secas

Sistema	Parámetros cinéticos			R^2 corregido	Distribución de residuos
Modelo difusión-relajación (Peppas y Sahlin)					
	k_d	k_r	m		
SS	45,74	0,60	0,18	0,98	Buena
SC	23,16	4,91	0,18	0,96	Buena

Si bien, para ambos sistemas se observa una contribución del mecanismo de relajación a la liberación, este resultó insignificante en relación al aporte difusivo ($k_d >> k_r$) (**Tabla 1**). Así mismo, el valor de k_d resultó mayor para el sistema simple, indicando una velocidad de liberación mayor como se mencionó anteriormente.
Respecto al comportamiento de cambio de masa en FGS, valores de % ΔW>0, corresponden a fenómenos de hinchamiento y % ΔW<0 a mecanismos de erosión (Wang *et al.* 2010). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4**.

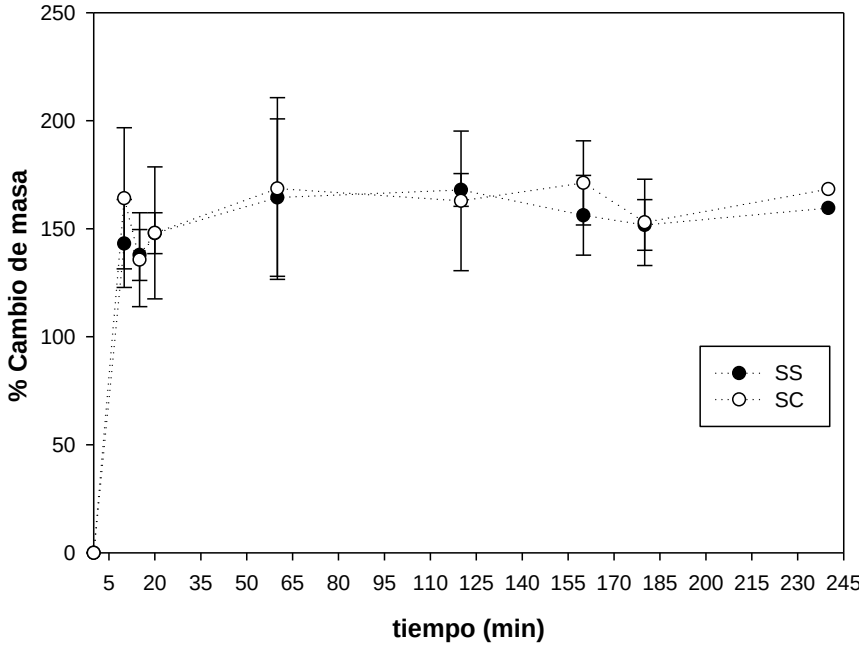


Figura 4. Cinética de hinchamiento en FGS de cápsulas secas SS y SC.

En el caso de los encapsulados obtenidos, el mecanismo predominante durante la inmersión en FGS, fue el hinchamiento (**Figura 4**). Ambos sistemas SS y SC, aumentaron su masa alrededor de un 150% con respecto al valor inicial en un tiempo de inmersión en FGS de 240 min. El mayor hinchamiento se alcanzó en los primeros tiempos de ensayo (0-10 min). Estos resultados correlacionan con lo observado en el perfil de liberación de los sistemas (**Figura 3**), siendo el porcentaje liberado de PT mayor al 30% en este mismo intervalo de tiempo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los encapsulados desarrollados en este trabajo, necesitan de una hidratación previa para que el compuesto activo comience a difundir hacia el medio. Las cápsulas secas poseen una matriz en estado vítreo (Tg= 55°C), condición en la cual existe muy baja movilidad de las moléculas. Por lo tanto, es necesario la plastificación y/o relajación de las cadenas poliméricas para que el compuesto activo pueda difundir dentro de la matriz (Brazel y Peppas 2000; Peppas y Khare 1993).

CONCLUSIONES

El agregado de almidón a la matriz de alginato de calcio mejoró la eficiencia de carga de polifenoles de la yerba mate. La inmersión de las cápsulas en FGS no modificó el contenido de polifenoles encapsulado. En ambos sistemas, la totalidad de compuestos fenólicos fue liberada en FGS tras un tiempo de inmersión de 240 min. La incorporación de almidón permitió obtener matrices menos porosas con respecto a las de alginato de calcio. Como consecuencia, el perfil de liberación de los polifenoles de yerba mate se modificó disminuyendo la velocidad, involucrando mecanismos de difusión e hinchamiento.

BIBLIOGRAFÍA

Anbinder PS, Deladino L, Navarro AS, Amalvy JI, Martino MN. (2011). Yerba mate extract encapsulation with alginate and chitosan systems: interactions between active compound encapsulation polymers. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences, 1*: 80-87.

Barba AA, d´Amore M, Chirico S, Lamberti G, Titomanlio G. (2009). A general code to predict the drug release kinetics from different shaped matrices. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 36*: 359-368.

Borgogna M, Bellich B, Zorzin L, Lapasin R, Cesàro A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry, 122*: 416-423.

Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. (2011). Recent advances on Ilex paraguariensis research: Minireview. *Journal of Ethnopharmacology, 136*: 378-384.

Brazel CS, Peppas NA. (2000). Modeling of drug release from swellable polymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 49*: 47-58.

Champagne CP, Fustier P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology, 18*: 184-190.

Deladino L, Anbinder PS, Navarro AS, Martino MN. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from Ilex paraguariensis. *Carbohydrate Polymers, 71*: 126-134.

Fang Z, Bhandari B. (2010). Encapsulation of polyphenols: a review. *Trends in Food Science & Technology, 21*: 510-523.

Gal A, Nussinovitch A. (2007). Hydrocolloid carriers with filler inclusion for diltiazem hydrochloride release. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 96*: 168-178.

Mastromatteo M, Mastromatteo M, Conte A, Del Nobile MA. (2010). Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology, 21*: 591-598.

Peppas NA, Khare AR. (1993). Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. *Advanced Drug Delivery Reviews, 11*: 1-35.

Pothakamury UR, Barbosa-Cánovas GV. (1995). Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science & Technology, 6*: 397-406.

Puttipipatkhachorn S, Pongjanyakul T, Priprem A. (2005). Molecular interaction in alginate beads reinforced with sodium starch glycolate or magnesium aluminum silicate, and their physical characteristics. *International Journal of Pharmaceutics, 293*: 51-62.

Rassis DK, Saguy IS, Nussinovitch A. (2002). Collapse, shrinkage and structural changes in dried alginate gels containing fillers. *Food Hydrocolloids, 16*: 139-151.

Sarmento B, Ferreira D, Veiga F, Ribeiro An. (2006). Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate Polymers, 66*: 1-7.

Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research, 36*: 177-187.

Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology, 62*: 47-55.

Wang Q, Hu X, Du Y, Kennedy JF. (2010). Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. *Carbohydrate Polymers, 82*: 842-847.

Wasburn E. (1921). Dynamics in capillary flow. *Physical Review, 17*(3), 273-283.

Zhang Y, Huo M, Zhou J, Zou A, Li W, Yao C, Xie S. (2010). DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS Journal, 12*: 263-271.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de la Yerba Mate por el financiamiento otorgado en el marco de los subsidios PRASY.

Efecto de variables de almacenamiento del aceite sobre los tocoferoles de germen de trigo

Magariño M., Mateo C.M., Nolasco S.M.

TECSE, Facultad de Ingeniería, UNCPBA, Olavarría, Argentina.
mmagarinio@fio.unicen.edu.ar

Resumen: El aceite de germen de trigo es fuente de ácidos grasos poliinsaturados, por lo cual es propenso a la oxidación, lo que puede ocasionar transformaciones en su calidad. Además tiene un alto contenido en tocoferoles (> 2188 mg/kg), los cuales actúan en la inhibición de los procesos de oxidación de lípidos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento del aceite de germen de trigo sobre la concentración de sus tocoferoles. Se trabajó con dos clases de germen: estabilizado mediante secado (E) y sin estabilizar (SE). El aceite se extrajo (Soxhlet) y se almacenó a diferentes temperaturas (-20°C, 5°C, 25°C y 47°C) durante 3 meses. La cuantificación de tocoferoles se realizó por HPLC. La temperatura y duración del almacenamiento afectó la concentración de tocoferoles. A temperaturas de 47°C y 25°C disminuyó significativamente la concentración de tocoferoles totales a lo largo del almacenamiento siguiendo una cinética de primer orden, incrementando la velocidad de degradación con el aumento de la temperatura. Las temperaturas de 5°C y -20°C afectaron de forma similar la concentración de tocoferoles totales y cada uno de los isómeros presentes, favoreciendo además la preservación de los ácidos grasos esenciales.

Palabras claves: aceite, almacenamiento, calidad, germen de trigo, tocoferoles.

Abstract: The wheat germ oil is a source of polyunsaturated fatty acids, being prone to oxidation, which may cause changes in quality. It also has high tocopherol content (>2188 mg/kg), which act in the inhibition of lipid oxidation. This work shows the effect of temperature and storage time of wheat germ oil on the concentration of tocopherols. The oil was obtained from two kinds of germ: stabilized by drying (E) and unstabilized (SE). The oil was extracted (Soxhlet) and stored at -20°C, 5°C, 25°C and 47°C for 3 months. The quantification of tocopherols was performed by HPLC. The storage temperature and time affected the concentration of tocopherols. At 47°C and 25°C, the concentration of total tocopherols, decreased significantly along storage following first order kinetics. The rate of degradation increases with rising temperature. Temperatures of 5°C and -20°C affected the concentration of total tocopherols similarly and the isomers present, besides favoring the preservation of essential fatty acids.

Key words: oil, storage, tocopherols, quality, wheat germ.

INTRODUCCIÓN

El germen de trigo es un subproducto de la molienda industrial de trigo. Es una fuente de nutrientes altamente concentrados y una de las más ricas en tocoferoles. Tiene un alto valor nutritivo, por tanto es muy bueno para fortificar productos alimenticios (Hemery *et al*. 2007).

El aceite de germen de trigo posee altos efectos beneficiosos para la salud como la reducción de los niveles de colesterol del hígado y del plasma, aumento de la resistencia física y posiblemente disminución de los efectos del envejecimiento, lo que se debe a la alta concentración de nutrientes que posee; es rico en vitamina E, fitoesteroles, policosanoles, tiamina, riboflavina y niacina (Eisenmenger y Dunford 2008).

El aceite de germen de trigo tiene el más alto contenido en tocoferoles de todos los aceites vegetales, por encima de 2188 mg/kg que consisten en α-tocoferol (53,9%), β-tocoferol (18,2%), γ-tocoferol (22,5%) y δ-tocoferol (5,4%) (Gunstone *et al.* 1994). Entre los fitoesteroles presentes en este producto, predominan el sitosterol y el campesterol (Eisenmerger y Dunford 2008). Además, este aceite es valorado debido a los ácidos grasos que contiene, de los cuales se destacan el ácido linoleico (55%), palmítico (16%), oleico (14%) y linolénico (7%) (Ramadan *et al*. 2008).

El rol principal de la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) es la inhibición de los procesos de oxidación de lípidos en alimentos y sistemas biológicos. Esta vitamina está implicada en la transformación del ácido araquidónico en prostaglandinas y reduce la velocidad de agregación plaquetaria (Belitz y Grosch 1997); se ha reportado como beneficiosa en el retardo de una variedad de enfermedades degenerativas tales como: enfermedades cardiovasculares, cáncer, desórdenes neurológicos, enfermedades inflamatorias, cataratas y

degeneración muscular relacionada con la edad, siendo muy importante en el mantenimiento del sistema inmunológico (Nolasco 2001).
El deterioro de la calidad de los lípidos debido al proceso oxidativo es de gran importancia económica y nutricional para la industria alimentaria, debido a la pérdida de ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles. Además la peroxidación de los lípidos produce radicales libres, los cuales están asociados a problemas de salud como la carcinogénesis. Aunque los antioxidantes no pueden evitar la autoxidación de los lípidos ni revertir la formación de peróxidos, pueden retrasar el proceso por eliminación de los ácidos grasos radicales (Goffman y Möllers 2000). Por tal motivo, se considera de interés conocer los efectos que distintas condiciones de almacenamiento del aceite de germen pueden tener sobre la concentración de tocoferoles.
Player *et al*. (2006) estudiaron la descomposición de α-, γ- y δ-tocoferol en aceite de soja durante 24 días de almacenamiento a 50°C. El α-tocoferol fue completamente destruido al día 16. Por otra parte, Chung (2007) al estudiar la cinética de degradación oxidativa de los tocoferoles como función del tiempo y la temperatura, disolviendo -α-, γ- y δ-tocoferol en glicerol y calentándolos a 100-250°C por 5-60 minutos, determinó que la reacción seguía una cinética de primer orden.
El objetivo principal del presente trabajo fue estudiar el efecto de la temperatura y del tiempo de almacenamiento del aceite de germen de trigo sobre la concentración de sus tocoferoles, analizando además la influencia sobre la composición acídica y la cinética de degradación de tocoferoles. Asimismo se evaluó el efecto del tratamiento de estabilización del germen sobre dichos parámetros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de muestras

El germen de trigo empleado fue suministrado por la empresa Molino Cañuelas SACIFI (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Se trabajó con dos clases de germen: uno, sometido a tratamiento de estabilización por calor (E) y otro sin estabilizar (SE). Los mismos se almacenaron en recipientes de plástico a 5°C hasta el momento de su uso.
Para la caracterización de las muestras de germen de trigo se determinó: contenido de humedad (AOCS Ba 2a-38 1998), rendimiento de aceite en un equipo Soxhlet (IUPAC 1.122 1992), contenido de proteínas (AOCS Ba 4a-38 1998), fibra cruda (AOCS Ba 6-84 1998) y cenizas (AOCS Ba 5a-49 1998).
Para caracterizar al aceite se realizaron las siguientes determinaciones: acidez libre (IUPAC 2.201 1992), índice de peróxidos (IUPAC 2.501 1992 y AOCS Cd 8-53 1998), composición acídica (Izquierdo 2007) y contenido de tocoferoles (AOCS Ce 8-89 1998).
Una vez caracterizado el aceite se procedió a su almacenamiento a cuatro temperaturas diferentes (-20°C, 5°C, 25°C y 47°C) durante 3 meses, depositados en viales de plástico de 1,5 mL sobre bandejas cubiertas para resguardo de la luz. Durante ese tiempo, el aceite fue analizado en cuanto al contenido de tocoferoles y composición acídica siguiendo las normas estandarizadas antes mencionadas.

Cinética de degradación de tocoferoles

La reacción de degradación de tocoferoles en aceite de germen de trigo, sigue una cinética de primer orden (Capitani *et al*. 2011).
Los valores de las constantes de velocidad de reacción (k_{exp}) en los distintos aceites fueron calculados mediante integración de la ecuación de velocidad para reacciones de primer orden **(1)**:

$$\ln Ct = \ln C_0 - k_{exp} \cdot t \qquad (1)$$

donde **Ct** es la concentración de los tocoferoles a los distintos tiempos de almacenamiento (**t**), $\mathbf{C_0}$ es la concentración inicial de los mismos. De la pendiente de la recta, graficando ln Ct vs. t, se obtiene el valor de la constante de velocidad de reacción, k_{exp}, determinada a cada temperatura de trabajo.

Análisis de datos

Para realizar los análisis de varianza (ANOVA) se utilizó el programa Software Infostat 6.0 (2003). En los casos en que se observaron diferencias significativas entre medias de variables estudiadas ($P<0,05$), las mismas se analizaron según la prueba de Tukey. Mientras que, para la realización del análisis de los datos de

cinética se utilizó el programa Microsoft Excel 2007.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del germen de trigo y del aceite

Las muestras de germen de trigo sin estabilizar (SE) y estabilizado por tratamiento con calor (E) presentaron un contenido de aceite y de proteína cercano al rango informado en literatura (27-30%) para este subproducto de la molienda del grano de trigo (Gunstone *et al*. 1994, İbanoğlu 2002), como así también el de fibra cruda (aproximadamente 3%) (Dunford 2005). En la **Tabla 1** se muestra la composición centesimal de ambas muestras.

Tabla 1: Composición centesimal de las muestras de germen de trigo

Componentes (% base seca)	**Germen de trigo**	
	Sin estabilizar (SE)	**Estabilizado por tratamiento con calor (E)**
Humedad	14,00 ± 0,01 a	7,65 ± 0,11 b
Aceite	10,3 ± 0,05 a	8,4 ± 0,05 b
Cenizas	4,00 ± 0,37 a	4,32 ± 0,13 a
Fibra cruda	1,19 ± 0,01 b	1,75 ± 0,01 a
Proteínas	32,68 ± 0,11 a	32,25 ± 0,26 a

Para cada componente, letras distintas indican diferencia significativa ($p \leq 0,05$)

Las investigaciones reportan un aumento en el rendimiento del proceso de extracción de aceite de algunas oleaginosas, mediante la utilización de diferentes enzimas o mezclas de ellas. Las más estudiadas son las celulasas, hemicelulasas, pectinasas y proteasas. Las mismas tienen la capacidad de romper uniones específicas, según cual se utilice, de los polisacáridos que conforman la pared celular de los tejidos vegetales, de este modo la estructura se hace más permeable y se facilita la liberación de aceite. Un tratamiento enzimático daña las paredes celulares mejorando la extracción de aceite. Dado que en el germen de trigo se encuentran las enzimas proteasas (García Olmedo 1964), éstas podrían ser las causantes del mayor rendimiento de aceite en el germen SE (**Tabla 1**), ya que en el mismo las enzimas se encuentran activas y podrían haber facilitado la extracción.

En la **Tabla 2** se pueden observar índices de calidad de los aceites obtenidos de germen de trigo SE y E.

Tabla 2: Índices de calidad iniciales de los aceites de ambas muestras de germen de trigo.

Índices de calidad	**Aceite de germen SE**	**Aceite de germen E**
Acidez libre[1]	8,2 ± 0,15 b	8,9 ± 0,03 a
Índice de peróxidos[2]	1,9 ± 0,12 a	1,2 ± 0,19 b

[1]Expresada en % de ácido oleico.

[2] Expresado en miliequivalentes de O2/kg de aceite. Para cada índice, letras distintas indica diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

Ambos aceites de germen de trigo presentaron una elevada acidez libre, indicativa de la acción de las lipasas presentes en el germen. Si bien, es de esperar que el tratamiento de estabilización inactive las lipasas y el índice de acidez resulte menor en el aceite de germen E, se observó un valor levemente superior respecto al del aceite del germen SE. Este comportamiento podría ser atribuido a una inactivación incompleta de las enzimas o a una infestación con moho durante el almacenamiento posterior al proceso de estabilización (Gardner e Inglett 1971).

Por otra parte, ambos aceites presentaron un bajo valor de índice de peróxidos, inferior al límite superior de 10,0 miliequivalentes de O_2/kg aceite establecido por el Códex Alimentarius (2012) para aceites no cubiertos

por normas estándares. El menor índice de peróxidos observado en el aceite de germen E puede atribuirse a la destrucción de lipoxigenasas (Zherebtsov *et al*. 2000).

Contenido de tocoferoles

La concentración inicial de tocoferoles totales fue de 3420 µg/g en el aceite de germen SE y 3545 µg/g en el aceite de germen E, siendo el componente mayoritario el isómero α-tocoferol (64,2 % y 64,6%, respectivamente), seguido por el β-tocoferol (33,3% y 32,7%, respectivamente) y pequeñas cantidades de γ-tocoferol (2,5% y 2,7%, respectivamente).

El análisis estadístico de los datos demostró que el aceite de germen E presentó una concentración significativamente mayor de tocoferoles totales ($p=0,0023$), de α-tocoferol ($p=0,0033$) y β-tocoferol ($p=0,0081$). La menor concentración de tocoferoles totales en el aceite de germen SE es concordante con el mayor índice de peróxidos detectado en el mismo, debido a poseer una menor protección frente al proceso de oxidación. El significativo menor contenido de tocoferoles en el aceite de germen de trigo SE ($p<0,05$) puede justificarse por un efecto de dilución al obtenerse un mayor rendimiento de aceite.

Composición de ácidos grasos

El análisis inicial de la composición acídica del aceite de germen de trigo, indicó la presencia de los ácidos grasos palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) y linolénico (18:3); siendo el ácido graso insaturado linoleico el componente mayoritario (60,8 % y 60,5%, respectivamente). Se detectó importante presencia del ácido saturado palmítico (18,5% y 18,2%, respectivamente) y el ácido monoinsaturado oleico (13,8% y 14,0%, respectivamente), siendo escaso el contenido en ácido esteárico (0,5 % para ambas muestras). Es de destacar un contenido apreciable de ácido linolénico (6,4% y 6,8%, respectivamente) similar a los aceites de canola (11%) (Zárate 2011) y de soja (8%) (Gunstone *et al*. 1994).

Según el análisis estadístico de los datos, el tratamiento de estabilización no afectó la composición acídica inicial ($p>0,05$).

Almacenamiento del aceite

Efecto del almacenamiento del aceite sobre sus tocoferoles

La concentración de tocoferoles totales del aceite disminuyó al transcurrir el tiempo de almacenamiento, siendo, en general, mayor el decrecimiento con el incremento de la temperatura (**Tablas 3 y 4**).

Tabla 3: Degradación de tocoferoles totales a las cuatro temperaturas de almacenamiento para aceite de germen SE. Letras distintas indican diferencias significativas (Test: Tukey, $p\leq0,05$)

Días de almacenamiento	Medias de la concentración de tocoferoles totales (µg/g)			
	47°C	**25°C**	**5°C**	**-20°C**
0	3420 j	3420 j	3420 j	3420 j
9	2450 e	3190 gh	3311 hij	3389 ij
23	1691 c	3130 g	3273 hi	3299 hij
49	415 b	2903 f	3244 gh	3283 hi
82	53 a	2195 d	3276 hi	3205 gh

Tabla 4. Degradación de tocoferoles totales a las cuatro temperaturas de almacenamiento para aceite de germen E. Letras distintas indican diferencias significativas (Test: Tukey, $p\leq 0,05$)

Días de almacenamiento	Medias de la concentración de tocoferoles totales (µg/g)			
	47°C	**25°C**	**5°C**	**-20°C**
0	3545 k	3545 k	3545 k	3545 k
9	3395 ghi	3345 fgh	3479 jk	3440 ij
23	2976 d	3336 fg	3396 ghi	3425 hij
49	1293 b	3206 e	3352 fgh	3306 f
82	499 a	2739 c	3395 ghi	3329 fg

Asimismo, dicha degradación de tocoferoles totales fue más rápida a temperaturas altas y en el aceite de germen SE. En el aceite de germen SE los tocoferoles totales disminuyeron 98%, 36%, 4% y 6% a las temperaturas de 47°C, 25°C, 5°C y -20°C respectivamente, entre el día cero de almacenamiento y el día 82. Por su parte, en el aceite de germen E, los porcentajes de disminución del contenido de tocoferoles totales fueron 86%, 23%, 4% y 6%, para 47°C, 25°C, 5°C y -20°C respectivamente, entre el día cero de almacenamiento y el día 82.

Para los aceites de ambas muestras de germen (SE y E), las variables tiempo y temperatura influyeron significativamente ($p<0,0001$) sobre la concentración de **tocoferoles totales**. Asimismo se detectó interacción significativa tiempo x temperatura ($p<0,0001$). A temperaturas de 47°C y 25°C se detectaron disminuciones significativas en la concentración de tocoferoles totales en todos los tiempos de análisis.

A 5°C disminuyó significativamente en el día 23 con respecto al contenido inicial, manteniéndose aproximadamente constante luego hasta el último día, en ambos aceites. A -20°C, en el aceite de germen SE se observó una disminución significativa a partir del día 49 de análisis, sin embargo, en el aceite de germen E, con mayor concentración de tocoferoles, el inicio de una disminución significativa y progresiva se detectó más tempranamente (9 días de almacenamiento).

El efecto de la temperatura fue más pronunciado sobre el aceite de germen SE, disminuyendo significativamente la concentración de tocoferoles en mayor medida en el almacenamiento a 47°C respecto a 25°C, y a su vez ambos, en general, en mayor proporción que en el aceite almacenado a 5°C y -20°C. En el aceite de germen E, con mayor contenido de tocoferoles, las diferencias fueron significativas en general a mayor tiempo de almacenamiento (≥ 23 días entre 47°C y 25°C y éstos dos con respecto a las menores temperaturas ensayadas).

Respecto a **α-tocoferol** (tocol mayoritario), presentó un comportamiento, en general, similar al determinado para tocoferoles totales (**Figuras 1 y 2**). Se observaron disminuciones progresivas de la concentración a lo largo del almacenamiento a 47°C y 25°C, para los aceites de ambas muestras (SE y E). A 5°C y -20°C las disminuciones significativas de la concentración de α-tocoferol recién se detectaron a ≥23 días de almacenamiento.

Se detectó un bajo efecto del almacenamiento sobre el **β-tocoferol**, disminuyendo, en general, progresivamente la concentración del mismo a lo largo del almacenamiento a 47°C y 25°C para los aceites de ambas muestras (SE y E) y observándose una escasa o nula reducción a 5°C y -20°C.

En el aceite de germen E, el **γ-tocoferol** solamente disminuyó significativamente durante el almacenamiento a 47°C, mientras que en el aceite de germen SE, se detectó disminución significativa de este isómero durante el almacenamiento a las distintas temperaturas analizadas, con excepción de -20°C

En general, para todos los isómeros se observó que no existen diferencias significativas entre el almacenamiento a 5°C y a -20°C y que a estas temperaturas es baja la disminución de los tocoferoles hasta 82 días.

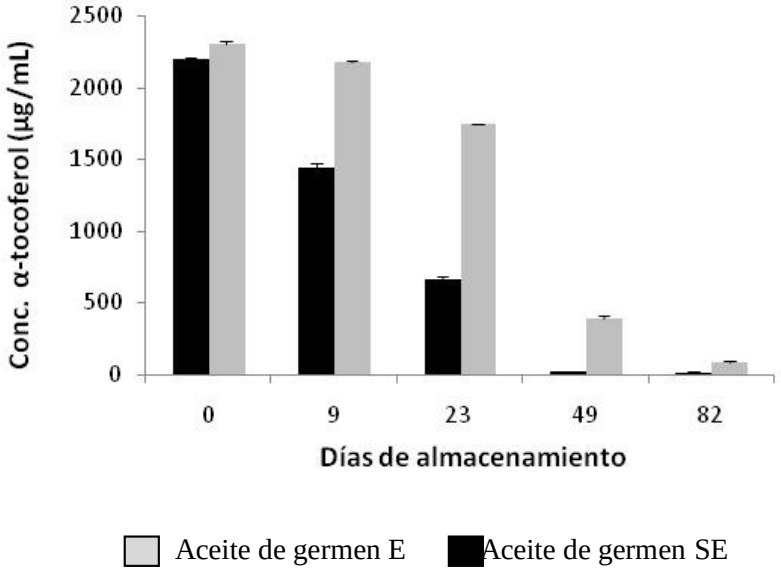


Figura 1: Degradación de α-tocoferol a 47°C

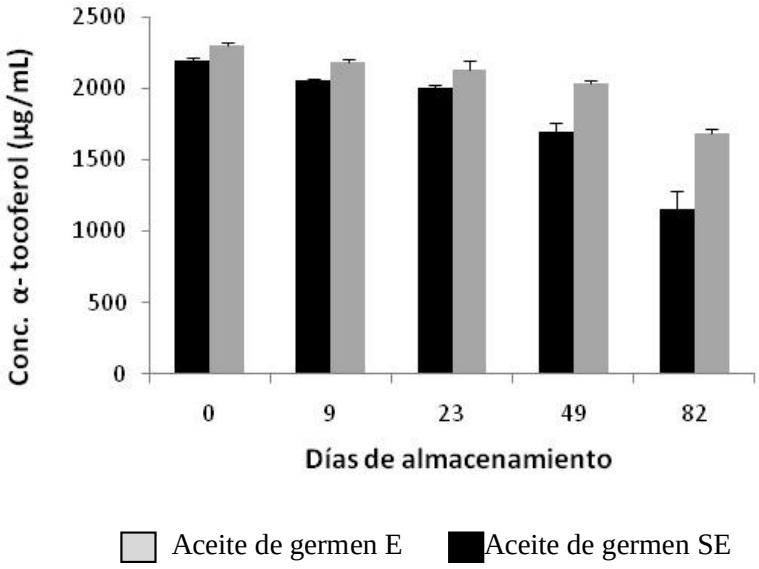


Figura 2: Degradación de α-tocoferol a 25°C

Efecto del almacenamiento del aceite sobre su composición acídica

El análisis estadístico de los datos indicó, para los ácidos grasos insaturados (linolénico, linoleico y oleico), que existe un efecto significativo de la temperatura ($p< 0,0001$, $p< 0,0001$ y $p<0,0248$, respectivamente en el aceite de germen SE y $p<0,0001$ para los tres ácidos grasos en el aceite de germen E), así como interacción tiempo x temperatura significativa ($p<0,0001$, $p<0,0001$ y $p<0,0336$, respectivamente en el aceite de germen SE y $p<0,0001$ para los tres ácidos grasos en el aceite de germen E). El efecto del tiempo fue significativo en ambos aceites sobre los ácidos linolénico y linoleico y sobre el ácido oleico solamente en el aceite de germen E ($p<0,0001$). Para los ácidos saturados, en general las diferencias observadas a mayor tiempo y temperatura (incremento de porcentajes relativos) pueden atribuirse a la disminución de los ácidos grasos poliinsaturados.

Efecto del almacenamiento del aceite sobre los parámetros cinéticos de degradación de sus tocoferoles

La reacción de degradación de los tocoferoles siguió una cinética de primer orden (**Figuras 3 y 4**). En las **Tablas 5 y 6** se pueden observar los valores de las constantes de velocidad y coeficientes de correlación determinados a cada temperatura en el aceite de germen SE y E, respectivamente. Los valores de k_{exp} calculados a cada temperatura son mayores en el aceite de germen SE, siendo más altos a 47°C y 25°C que a las otras temperaturas.

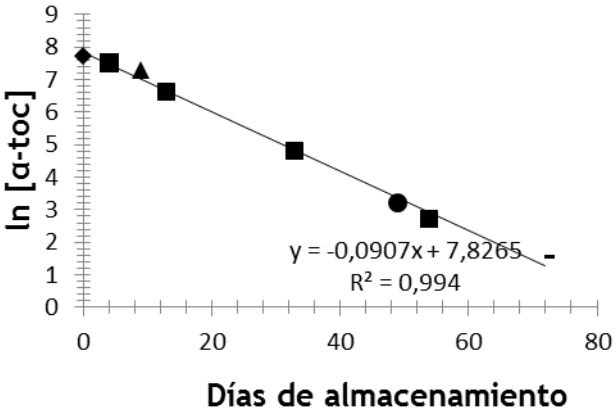


Figura 3. Degradación de α-tocoferol a 47°C en aceite de germen SE

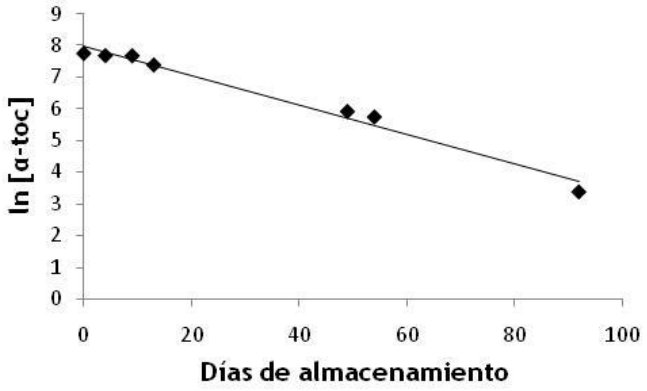


Figura 4. Degradación de α-tocoferol a 47°C en aceite de germen E

Tabla 5: Constantes de velocidad de reacción y coeficientes de correlación para la degradación de tocoferoles en aceite de germen SE

Tocoferoles	Temperatura (°C)	Constante de velocidad (1/días)	R
Tocoferoles totales	47	0,0537	0,995
	25	0,005	0,996
α-tocoferol	47	0,0907	0,997
	25	0,0073	0,993
β-tocoferol	47	0,0463	0,995
	25	0,0026	0,988
γ-tocoferol	47	0,0261	0,993
	25	0,0016	0,986

Tabla 6: Constantes de velocidad de reacción y coeficientes de correlación para la degradación de tocoferoles en aceite de germen E

Tocoferoles	Temperatura (°C)	Constante de velocidad (1/días)	R
Tocoferoles totales	47	0,0257	0,996
	25	0,003	0,998
α-tocoferol	47	0,0466	0,99
	25	0,0036	0,996
β-tocoferol	47	0,0165	0,987
	25	0,0016	0,994
γ-tocoferol	47	0,017	0,996
	25	0,0035	0,98

Por otro lado, en ambos aceites, los valores de constantes de velocidad de degradación obtenidos para α-tocoferol son superiores a los de β-tocoferol, y éstos a los de γ-tocoferol, lo que sugiere que la degradación térmica de γ-tocoferol es menor que la de β-tocoferol y más lenta aún que la de α-tocoferol.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se analizó la influencia de la temperatura y el tiempo de almacenamiento del aceite de germen de trigo sobre la degradación de los tocoferoles y ácidos grasos como así también el efecto de un tratamiento de estabilización de germen sobre los índices de calidad y genuinidad de su aceite.

El aceite de germen de trigo estabilizado (E) presentó una mayor concentración de tocoferoles totales (3545

µg/g) que el aceite de germen sin estabilizar (SE; 3420 µg/g), que puede justificarse por un efecto de dilución al obtener un mayor rendimiento de aceite en SE. La menor concentración de tocoferoles totales en el aceite del germen sin estabilizar (SE) es concordante con el mayor índice de peróxidos detectado en el mismo, debido a poseer una menor protección frente al proceso de oxidación.

El ensayo de almacenamiento indicó que la temperatura y duración del mismo afectó la concentración de tocoferoles en los dos tipos de aceites. Las temperaturas de almacenamiento que mayor influencia tuvieron sobre la degradación de los tocoferoles fueron 47°C y 25°C, siendo significativamente mayor su efecto sobre la concentración de tocoferoles respecto a las temperaturas de 5°C y -20°C. Almacenar el aceite hasta 82 días a 5°C tiene el mismo efecto sobre los tocoferoles que almacenarlo a -20°C y preservan la mayor cantidad de tocoferoles totales y de cada uno en particular. Los ácidos grasos insaturados (linolénico, linoleico y oleico) fueron afectados significativamente por la temperatura en ambos aceites, favoreciendo la preservación de los ácidos grasos esenciales (linoleico y linolénico), el almacenamiento a bajas temperaturas.

La reacción de degradación de los tocoferoles en el aceite de germen de trigo sigue una cinética de primer orden, incrementando la velocidad de degradación con el aumento de la temperatura. El α-tocoferol, con valores mayores de las constantes de velocidad, fue menos estable que β- y γ-tocoferol,

El estudio sobre los cambios sufridos por el aceite es un aporte a la mejora en las condiciones de almacenamiento y tratamiento del mismo con el fin de preservar su calidad y valor nutricional. Asimismo, brinda información a los sectores productivos para la optimización de sus procesos, obteniendo mayores rendimientos y calidad y menores costos.

BIBLIOGRAFÍA

AOCS. (1998). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS Press, Champaign, Illinois, Estados Unidos.

Belitz H.D. y Grosch W. (1997). Química de los alimentos. 2ª ed. Zaragoza: Acribia. Pág. 256.

Capitani M., Mateo C. M. y Nolasco S. M. (2011). Effect of temperature and storage time of wheat germ on the oil tocopherol concentration. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 28: 243-250.

Chung H.Y. (2007). Oxidative Degradation Kinetics of Tocopherols during Heating. Journal Food Science and Nutrition, 12: 115-118.

Codex Alimentarius. http://www.codexalimentarius.net/web/standard _ list.do? lang =en, última fecha de ingreso 1/10/2012.

Dunford, N.T. (2005). Germ oils from different sources, en: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 6ª ed. Editor: Shahidi, F.

Eisenmenger M. y Dunford N.T. (2008). Bioactive Components of Commercial and Supercritical Carbon Dioxide Processed Wheat Germ Oil. Journal of the American Oil Chemists' Society, 85: 55-61.

García Olmedo F. (1964). Las proteasas en el trigo y sus productos. Universidad Politécnica de Madrid, España.

Gardner H.W. e Inglett G.E. (1971). Food products from corn germ: enzyme activity and oil stability. Journal of Food Science, 36: 645-648.

Goffman F. y Möllers C. (2000). Changes in Tocopherol and Plastochromanol-8 Contents in Seeds and Oil of Oilsees Rape (Brassica napus L.) during Storage as Influence by Temperature and Air Oxygen. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 1605-1609.

Gunstone F.D, Harwood J.L y Padley, F.B. (1994). The Lipid Handbook. 2ª ed. Londres: Chapman & Hall. Pág: 106-107.

Hemery Y., Rouau X., Lullien-Pellierin V., Barron C. y Abecassis J. (2007). Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. Journal of Cereal Science, 46: 327-34.

İbanoğlu E. (2002). Kinetic study on colour changes in wheat germ due to heat. Journal of Food Engineering, 51: 209-213.

IUPAC. (1992). Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivates, 7º edición, C. Paquot y A: Hautfenne (eds.), International Union of Pure and Applied Chemistry, Blackwell Scientific Publications Inc., Oxford.

Izquierdo N.G. (2007). Factores determinantes de la calidad de aceites en diversas especies. Tesis doctoral. Unidad Integrada Balcarce, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Argentina.

Nolasco S.M. (2001). Tocoferoles en el aceite de girasol (*Helianthusannuus* L). Bases para explicar la variación de la concentración de tocoferoles totales en el aceite. Tesis grado de Magíster en Investigación

biológica aplicada, UNCPBA, Facultad de Agronomía, Azul, Argentina.
Player M.E., Kim, H.J., Lee, H.O. y Min, D.B. (2006). Stability of α-, γ-, or δ-Tocopherol during Soybean Oil Oxidation. Journal of Food Science, 71: 456-460.
Ramadan M.F., El-Said Showky, H. y Mohamed Sulieman, A.E. (2008). Comparison between the effect of γ-irradiation and roasting on the profile and antioxidant activity of wheat germ lipids. Grasas y Aceites, 59: 166-17.
Zárate V. (2011). Cinética de extracción de aceite de Canola: efectos de distintos pretratamientos. Tesis de grado de Licenciatura en Tecnología de los alimentos. Facultad de Ingeniería, UNCPBA, Facultad de Ingeniería, Olavarría, Argentina.
Zherebtsov N.A., Popova, T.N. y Zyablova, T.V. (2001). Identification of Catalytically Active Groups of Wheat Germ Lipoxygenase. Applied Biochemistry and Microbiology, 37: 145-149.

AGRADECIMIENTOS
Los autores de este trabajo agradecen a la UNCPBA, a la empresa Molino Cañuelas SACIFI por la donación de las muestras de germen de trigo y a la Ing. Miriam Cocconi.

Efecto del pH y el almacenamiento sobre los fructooligosacáridos del yacón (*Smallantus sonchifolius*)

Maldonado S., Nuñez Souza M.

Laboratorio de investigación de Ingeniería para el Desarrollo Agroindustrial Regional – IDEAR, Centro de Investigación de Tecnología de Alimentos – CITA, Facultad de Ingeniería, UNJu, San Salvador de Jujuy, Argentina.
smaldonado@fi.unju.edu.ar

Resumen: El yacón, tubérculo originario de la región andina sudamericana, acumula fructooligosacáridos (FOS) en su raíz. Los objetivos del presente trabajo fueron: estudiar el contenido de FOS en yacón y en un extracto concentrado y envasado, evaluando la aplicabilidad del método enzimático; estudiar el comportamiento de los FOS frente a variaciones de pH y al tiempo de almacenamiento. Se trabajó con tubérculos provenientes de Bárcena, provincia de Jujuy. El contenido de FOS en el yacón fresco fue de 3,83 ± 0,03 g /100 g. A los 30 días de almacenamiento el producto envasado sufre una pérdida del 14,8% de su contenido de FOS. La apertura del envase a cualquier tiempo de almacenamiento provoca una importante disminución en los FOS del producto. En promedio las muestras pierden un 14,6 ± 0,4% de su contenido de FOS al cabo de 48 hs de apertura del envase. El contenido de FOS permanece constante entre valores de pH 4,5 y 7. El efecto del almacenamiento sobre los FOS del producto final presentó una disminución en la cantidad inicial. Esta situación merece ser estudiada en profundad para lo cual podría cambiarse el material del film del envase, a los fines de evitar o disminuir dicha pérdida.

Palabras claves: yacón; fructooligosacáridos; prebióticos

Abstract: The yacón is a tuber native of the Andean region of South-America, that accumulates fructooligosaccharides (FOS). The objectives of this work were: to study the FOS content in the tuber and in a purified packed extract of yacón. We evaluated the applicability of the enzymatic method; we studied the behavior of FOS when the pH varies and when storage time passes. We worked with tubers from Bárcena - Jujuy province. The content of FOS in fresh yacón was 3.83 ± 0.03 g/100g. The packaged product lost 14.8% of FOS in 30 days of storage. The FOS content decreased significantly by opening the packaging, at any storage time. The samples lost 14.6 ± 0.4% of FOS after 48 hours of opening. The FOS content remains constant between pH values of 4.5 and 7.5. The effect of storage over the FOS content of the final product showed a decrease in the initial amount. This deserves to be studied in depth, e.g. changing the packaging film material, in order to avoid or reduce the loss.

Keywords: yacón; fructooligosaccharides, prebiotics

INTRODUCCIÓN

El yacón es un tubérculo originario de la región andina sudamericana cuya raíz, a diferencia de la mayoría de las raíces y tubérculos que almacenan almidón, acumula una gran diversidad de azucares. La planta de yacón es una hierba perenne capaz de crecer hasta 2 metros de alto, clasificada taxonómicamente dentro de las asteráceas. Posee un sistema de raíces tuberosas que llegan a alcanzar una longitud de 10 a 25 cm de diámetro (Grau y Rea 1997). Su nombre científico es *Smallanthus sonchifolius* y los nombres utilizados en diferentes partes de Los Andes son llaqon, llacum, llacuma, yacumpi, aricuma, chicama, jiquima y jiquimilla. El hábitat natural del yacón es la zona de los Andes comprendida entre los 800 y 2800 msnm y regímenes de temperatura característicos de climas templados y subtropicales. Debido a su gran capacidad adaptativa se cultiva también en muchas otras partes del mundo como ser Brasil, China, Corea, Estados Unidos, Japón, Nueva Zelandia, Checoslovaquia y Taiwán (Ohyama et al. 1990, Grau y Rea 1997; Yan et al. 1999, Seminario et al. 2003).

El yacón contiene principalmente agua e hidratos de carbono. Los hidratos de carbono se acumulan en forma de fructooligosacáridos y azúcares simples: sacarosa, fructosa y glucosa. Aunque la proporción de cada azúcar puede variar debido a diferentes factores (el cultivar, la época de siembra y cosecha, temperatura en poscosecha, entre otros), según Maldonado et al. (2008) en concordancia con Hermann et al. (1999) se puede considerar la siguiente composición (en base seca): fructooligosacáridos 40 a 70%, sacarosa 5 a 15%, fructosa 5 a 15% y glucosa menos del 5%. Los fructooligosacáridos, también conocidos como oligofructanos

o simplemente FOS (Hogarth et al. 2000) pertenecen a una clase particular de azúcares conocidos con el nombre de fructanos. La estructura fundamental de los fructanos es un esqueleto de unidades de fructosa, unidas entre sí por enlaces glucosídicos β (2-1) y en raras ocasiones por enlaces β (2-6). La presencia de enlaces β (2-1) hace que los FOS no sean digeribles en el tracto digestivo, lo que a su vez tiene como consecuencia que tengan un bajo valor calórico y funcionalidad como fibra dietaria (Niness, 1999). Son considerados como prebióticos ya que estimulan el crecimiento selectivo de bacterias intestinales promotoras de la salud, especialmente las bifidobacterias (Pedreschi et al. 2003). Se ha observado también un efecto favorable en la asimilación del calcio (Andersson et al. 2001).

Sin embargo el yacón, como vegetal fresco, tiene corta vida útil expuesto a condiciones ambientales (30 a 45 días), por lo tanto es necesario aplicar tecnologías para aumentar su vida útil y potenciar sus atributos naturales, por ejemplo la técnica de barreras o de métodos combinados disminuyendo el pH, la elaboración de encurtidos mediante el agregado de ácido con la consiguiente disminución del pH, entre otros. Como consecuencia de esto se hace necesario estudiar la influencia del pH sobre los FOS extraídos del yacón, dada la importancia de mantenerlos durante el proceso. Los objetivos abordados en este trabajo fueron:

1) el estudio del contenido de FOS en el yacón y en un producto sólido obtenido a partir del extracto acuoso del tubérculo, evaluando la aplicabilidad del método enzimático.
2) el comportamiento de los FOS frente a diferentes valores de pH, así como su variación con el tiempo de almacenamiento

MATERIALES Y METODOS

Material botánico

Se utilizaron tubérculos de yacón, adquiridos en la localidad de Bárcena, provincia de Jujuy, Argentina. Se adquirió directamente de los productores y se trasladó al laboratorio, acondicionado en bolsas de 10 Kg de capacidad. Se mantuvieron en refrigeración entre 8-10ºC hasta los ensayos, tiempo no mayor a los 7 días. Se trabajó con dos lotes de 10 kg cada uno, cosechados con una diferencia de 15 días.

Determinación del contenido de sólidos solubles

Se determinó el contenido de sólidos solubles en la muestra fresca usando un refractómetro marca QUARTZ, serie 2001344. Los resultados se expresaron en º Brix.

Preparación de las muestras

Los individuos de cada lote se pesaron al 0,0001 g en balanza analítica marca DENVER, modelo APX – 200. Se trozaron, escaldaron en vapor saturado el tiempo necesario para alcanzar 75ºC en el centro térmico y se homogeneizaron en un omnimixer marca OMNI International, incorporando diferentes proporciones de agua para mejorar la extracción. La suspensión obtenida se filtró para obtener un líquido límpido. Sobre una porción de este líquido se realizaron las determinaciones del contenido de FOS. Parte del filtrado se utilizó para evaluar el efecto de los cambios del pH del medio y sólidos solubles.

Métodos de análisis y cuantificación de FOS

La determinación se realizó por método 999.03 de AOAC, el cual consiste en realizar una extracción con agua caliente y tratarla con enzimas específicas: sacarasa, α-amilasa y maltasa. Estas destruyen todos los carbohidratos presentes menos los fructanos. Los azúcares reductores resultantes se reducen a alcoholes por medio de una disolución alcalina cuyo exceso se neutraliza con ácido acético diluido. Los fructanos ya purificados y libres de otros polisacáridos, se hidrolizan con una mezcla de exo y endo inulasas. Los azúcares reductores derivados de este tratamiento reaccionan con una solución ácida compuesta por p-hidroxibenzoico e hidracina generándose un compuesto coloreado que puede medirse espectrofotométricamente (MacCleary et al, 2000). Se usó para ello un espectrofotómetro marca Spectrum, modelo SP 2100 uv

Evaluación del efecto del pH sobre el contenido de FOS y sobre los sólidos solubles

Se estudió el efecto del pH sobre la variación del contenido de FOS y los sólidos solubles del jugo filtrado, frente a distintos niveles de alcalinidad y acidez, por el agregado de dos agentes: un álcali (hidróxido de calcio) y un ácido (ácido cítrico). Se tomaron 10 valores entre 4 y 8. Se midió el pH utilizando un pH metro digital marca HANNA, Modelo HI 8424.

Estudio del efecto del Almacenamiento sobre el contenido de FOS

Se utilizó un extracto de FOS, obtenido del yacón y concentrado, a partir del cual se obtuvo un sólido granulado según Patente de invención N° P-080103806. Se almacenó en films de polipropileno baja permeabilidad al O_2 y al vapor de agua con las siguientes características: espesor (micrones): 102, transmisión al oxígeno a 23 °C, 0% HR cc/m^2/24 hs: 1; transmisión al vapor de agua a 38 °C, 90% HR - g/m^2/24 hs: 5, rango de Tº de sellado100° – 200 °C, resistencia nominal al sellado: 4 kg/25 mm. Se tomaron muestras del sólido granulado recién elaborado (t = 0) y a los 15 y 30 días de almacenamiento. Al tiempo pre-establecido se abrieron los envases y se extrajo una porción para análisis (muestra A). El resto se mantuvo bajo refrigeración en las mismas condiciones anteriores, pero con el envase abierto, del cual al cabo de 48 hs se extrajo una nueva porción para análisis (muestra B). Ambas porciones de cada muestra se analizaron según el método enzimático-espectrofotométrico (método 999.03 de AOAC).

Análisis estadístico

Los resultados del efecto del tiempo de almacenamiento sobre el contenido de FOS del producto final se evaluaron estadísticamente, usando el software SPSS versión 12, a través de análisis de la varianza y el test de Duncan, con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La selección apropiada del protocolo de determinación se realizó teniendo en cuenta la siguiente composición relativa del yacón (en base seca): FOS 40 a 70%, sacarosa 5 a 15%, fructosa 5 a 15% y glucosa menos del 5% (Hermann et al. 1999). Se aplicó el método AOAC 999.03: a) suponiendo 12-50 % FOS (Muestra 1), b) suponiendo 50-100 % FOS (Muestra 2). Se realizaron los ensayos de control correspondientes (fructanos/celulosa y sacarosa/celulosa). Ambos permitieron verificar y controlar la efectividad de la técnica; el primero se efectuó sobre el contenido de FOS por cada lote de las muestras analizadas y el segundo sobre la eficiencia de los reactivos por cada nuevo lote del mismo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1

Tabla 1: Determinación de FOS. Selección del rango de concentración

	Muestra 1 12-50% FOS	**Muestra 2** 50-100% FOS	**control** fructanos/celulosa	**control** sacarosa/celulosa
ΔA	0,361	0,158	0,555	0,022
f	40,971	40,971	40,971	34,105
SDF1	1,322	1,322	1,322	1,597
SDF2	1,320	1,320	1,320	1,540
SDF3	1,312	1,312	1,312	1,613
Abs (M)	1,231	1,048	0,577	0,187
Abs (D)	1,208	1,036	0,591	0,190
Abs (B)	0,859	0,726	0,029	0,167
(g FOS/100 g Muestra)	18,31 ± 0,82	16,1 ± 0,4	28,2 ± 0,5	0,182 ± 0,02
(g FOS/ 100 g Yacón)	3,0 ± 0,1	2,68 ± 0,07		

Se obtuvieron valores de FOS entre 12 – 50%, encontrándose además que para su completa extracción es necesario agregar 50 ml de agua destilada, lo que favorece además la posterior acción enzimática.

Se verificó la efectividad del ensayo de control de fructanos/celulosa con el valor obtenido de 28,2 ± 0,5% de fructanos. De acuerdo a los resultados obtenidos este ensayo presentó un error del 2,097% en relación al valor de referencia. Se verificó la afectividad del ensayo de control sacarosa/celulosa obteniéndose 0,2% de fructanos. De acuerdo a esto, el estudio presentó un error del 9 % en relación al valor de referencia, a los fines experimentales se consideró aceptable.

En la Tabla 2 se muestran las principales características del tubérculo y el jugo de yacón

Tabla 2: Características de la materia prima

Lote de Procesamiento 1			
yacón	Peso c/cáscara (gr)	Peso s/cáscara (gr)	Brix
Promedio	**229 ± 75**	**174 ± 58**	**6,5 ± 0,5**
Totales	**1148,1**	**874,6**	

Jugo Filtrado	
Total (gr)	830,3
PH	6,25
BRIX	6,0

Lote de Procesamiento 2			
yacón	Peso c/cáscara (gr)	Peso s/cáscara (gr)	Brix
Promedio	**204 ± 23**	**163 ± 16**	**7 ± 1**
Totales	**1020,9**	**817,7**	

Jugo Filtrado	
Total (gr)	751,3
PH	6,22
BRIX	5,5

El rendimiento del yacón en la obtención de jugo filtrado fue del 72,96± 0,5 p/p.
Se determinó el contenido de FOS en el yacón fresco, pelado y escaldado, verificando la eficacia del método a través de los controles. El valor promedio obtenido resultó de 3,6 ± 0,3 g de FOS/100 g de yacón. El ensayo de control fructanos/celulosa arrojó un error de 1,5% y 3,05% para las muestras de raíces del lote 1 y 2 respectivamente.
Los resultados obtenidos a partir de la alcalinización del extracto acuoso de yacón se representan en la Figura 1. Los datos experimentales ajustaron a una ecuación polinómica de grado 4:

$$Y = -0{,}0105x^4 + 0{,}3002x^3 - 3{,}202x^2 + 15{,}145x - 23{,}695 \qquad R^2 = 0{,}984$$

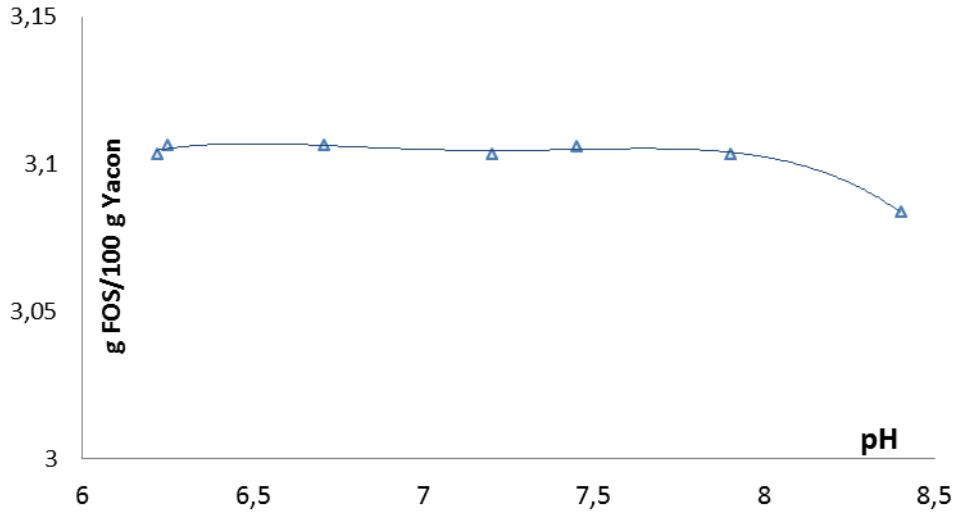


Figura 1: Efecto del pH sobre el contenido de FOS durante la alcalinización

En la Figura 1 se observa que a pH alcalinos superiores a 8 (ocho) el contenido de FOS disminuye (aunque levemente), mientras que para valores inferiores a éste, existe un rango importante de pH para el cual prácticamente el contenido de FOS no varía. Esto se debe a que el agregado de álcali hasta niveles de pH inferiores a 8 (ocho), logra que precipiten compuestos químicos diferentes a los FOS sin que se produzca degradación por efecto del tratamiento.
Se encontró que cuando se acidifica el medio el contenido de FOS permanece constante en 3,106 g FOS/100g, para valores de pH entre 7,5 y 4.
La relación entre el pH y los sólidos solubles del jugo se muestra en la Figura 2, en la misma se observa una disminución de los sólidos solubles a valores inferiores a pH 4,5 y superiores a pH 7,5, mientras que para valores intermedios de pH los sólidos solubles se mantienen prácticamente constantes. Los datos experimentales ajustaron a una ecuación polinómica de grado 4:

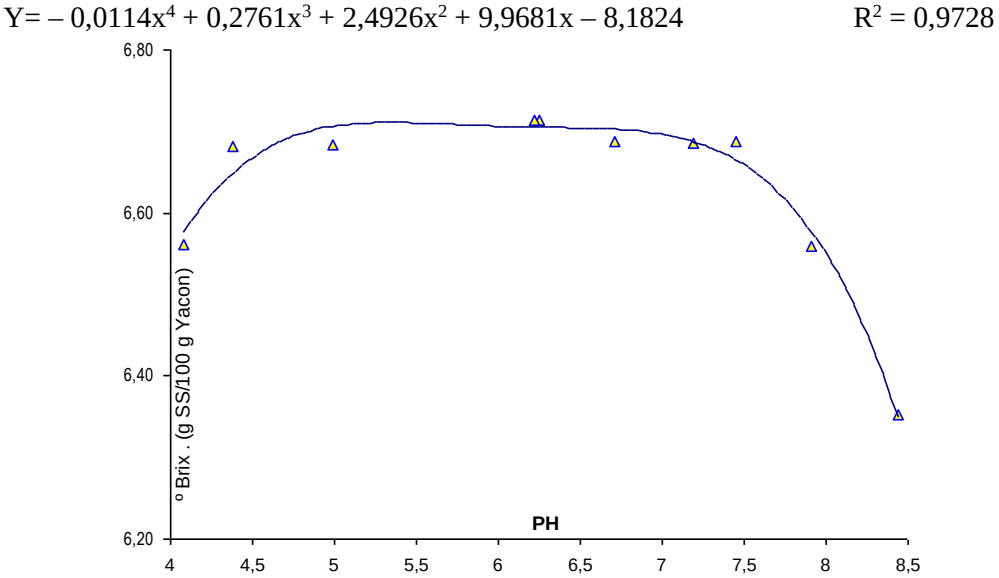


Figura 2: Variación del contenido de sólidos solubles (°Brix) con el pH.

Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el contenido de FOS del producto final

El estado vítreo de los cristales ricos en FOS se pierde casi instantáneamente por higroscopicidad, una vez que el producto es expuesto al ambiente, generándose una sustancia de aspecto meloso y muy viscosa. Sin embargo luego de 15 a 20 días de almacenamiento se observó en distintas muestras de producto envasado y almacenado que los cristales se degradaban de forma natural y gradualmente. En este sentido se evaluó si este proceso traía consigo pérdidas o disminución del contenido de FOS durante el almacenamiento. Este comportamiento se observa en la Figura 3, el que responde a una ecuación lineal.

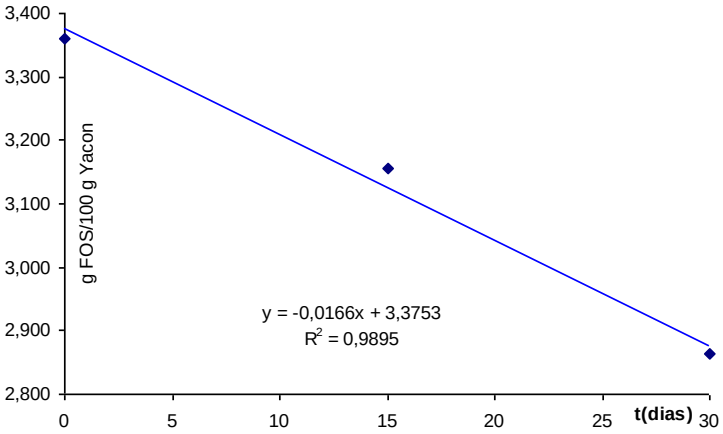


Figura 3: variación del contenido de FOS durante el almacenamiento

De acuerdo a los resultados obtenidos, la pérdida de FOS por almacenamiento (Muestras A) resultó igual a 6,09% a los 15 días y 14,82% a los 30 días. El análisis de la varianza dio un valor p = 0,004. Considerando un nivel de significación de 0,05 se puede afirmar que hay una diferencia significativa en el contenido de FOS a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento. Esta disminución en el contenido de los FOS durante el almacenamiento es debida a que las moléculas de azúcares presentes se depolimerizan convirtiéndose en azúcares simples y/o sustancias que luego no son detectados por el método de análisis. Estos mecanismos pueden ser del tipo oxidativos, provocando liberación de agua intramolecular del interior de la matriz cristalina de los azúcares (retrogradación). Las causas pueden ser transferencia de oxígeno del aire a través del film durante el almacenamiento o absorción de vestigios de humedad del aire, previa operación de envasado por exposición del producto al ambiente.

La pérdida en el contenido de FOS por apertura del envase (Muestras B) resultó: 15,03%, 20,85% y 29,00% a los 2, 17 y 32 días. Las causas probables de éste comportamiento también pueden ser la transferencia de oxígeno del aire a través del film y/o que el producto absorbiera humedad del ambiente ya que al abrir el envase se liberó todo el vacío que contenía, permitiendo la entrada de oxigeno del aire.
A través del análisis de la varianza con un valor p=0,006 menor que sig. = 0,05 podemos establecer que hay pérdidas significativas de FOS por apertura del envase durante el almacenamiento refrigerado, razón por la cual el producto deberá ser envasado en porciones individuales suficientes como para ser consumido inmediatamente después de ser abierto el envase.

CONCLUSIONES

El contenido de FOS permanece constante a pH entre 5 y 8. La relación entre los sólidos solubles y el pH disminuye a valores inferiores a pH 4,5 y superiores a pH 7,5. En ambos casos existe un rango importante de pH (4,5 -7,5) para el cual el contenido de FOS y los sólidos solubles se mantienen prácticamente constantes.
Al cabo de 30 días de almacenamiento el producto en el envase sufre una pérdida del 14,8% de su contenido inicial de FOS.
La apertura del envase a cualquier tiempo de almacenamiento provoca una importante disminución en el contenido de FOS del producto. En promedio las muestras pierden un 14,6 ± 0,4% de su contenido de FOS al cabo de 48 hs de apertura del envase.
El efecto del almacenamiento sobre los FOS del producto final presentó una disminución en la cantidad inicial. Esta situación merece ser estudiada en profundad para la cual podría cambiarse el material del film del envase a los fines de evitar o disminuir dicha pérdida.

BIBLIOGRAFÍA

Andersson H, Asp NG, Bruce A, Roos S, Wadstrom T, Wold AE. 2001. Health effects of probiotics and prebiotics. A literature review on human studies. Scandinavian Journal of Nutrition, 45: 58-75.
Grau A, Rea J. 1997. Yacon. Smallanthus sonchifolius (Poepp. & Endl.) H. Robinson. In M. Hermann, & J. Heller (Eds.), Andean roots and tuberous roots: Ahipa, Arracacha, Maca and Yacon. Promoting the conservation and use of underulitized crops. IPK, Gatersleben/IPGRI, Rome, 174: 199-256.
Hermann M, Freire I, Pazos C. 1999. Compositional diversity of the yacon storage root. CIP Program Report http: www.cipotato.org/publications/program_reports/97_98/51yacon. pdf. 8.7.2010.
Hogarth, AJ, Hunter DE, Jacobs WA, Garleb K A, Wolf BW. 2000. Ion chromatographic determination of three fructooligosaccharide oligomers in prepared and preserved foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(11):5326-5330.
Maldonado M, Luna Pizarro P, Martinez V, Villatarco M, Singh J. 2008. Producción y comercialización del yacon (Smallanthus sonchifolia) en comunidades rurales del Noroeste Argentino.
Niness K. 1999. Breakfast foods and teh health benefits of inulin and oligofructose. Cereal Foods World. 44(2)
Ohyama T, Ito O. Yasuyoshi S, Ikarashi T, Minami-sawa K, Kubota M, Tsukinashi T, Asami T. 1990. Composition of storage carbohydrate in tuber roots of yacon (Polymnia sonchifolius). Soil Sci. Plant Nutr, 36
Pedreschi R, Campos D, Noratto G, Chirinos R, Cisneros-Zevallos L. 2003. Andean yacon root (Smallanthus sonchifolius Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. J. Agric. Food Chem, 51:5278–84.
Seminario J, Valderrama M, Manrique I. 2003. El yacón: Fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. Lima, Perú: Centro Internacional de la papa (CIP), Universidad Nacional de Cajamarca, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE), disponible en http://www.cipotato.org/market/ PDFdocs/Yacon_Fundamentos_password.pdf. 14.7.10.
Yan X, Suzuki M, Ohnishi-Kameyama M, Sada Y, Nakanishi T, Nagata T. 1999. Extraction and identification of antioxidants in roots of yacon (Smallanthus sonchifolius). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(11): 4711-4713.

Estabilidad frente a la refrigeración y congelación de leche de soja obtenida por micronización en ausencia y presencia de calcio

Márquez A.L.[1,2], Salvatore G.N.[1], Otero R.G.[1], Wagner J.R.[1,2], Palazolo, G.G.[1,2]

1: Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de Alimentos (LIFTA), Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina
2: CONICET
gpalazolo@unq.edu.ar

Resumen: El objetivo fue estudiar el efecto de la refrigeración y la congelación sobre la estabilidad de leche de soja preparada mediante micronización a partir de una harina desgrasada, en ausencia y presencia de calcio. Luego de 1 día de refrigeración, la leche con calcio presentó un menor tamaño de partícula y una mayor viscosidad aparente que la muestra sin calcio, atribuible a la formación de agregados proteicos en presencia del catión. Durante 9 días de refrigeración se produjo un aumento en el tamaño de partícula de las dos leches, sin afectar apreciablemente la homogeneidad de los sistemas. La reología de la leche sin calcio tampoco se vio afectada y la muestra fortificada con el catión sólo presentó una leve disminución en su viscosidad, probablemente debido a la formación de agregados más compactos y menos hidratados con menor interacción entre sí. Por su parte, la congelación durante 1 día produjo tamaños de partícula mucho mayores que el tratamiento anterior, atribuido a un mayor grado de agregación proteica, y luego de 9 días se observó una alta desestabilización de ambos sistemas con un aumento importante de tamaño de partícula. Este último efecto fue más pronunciado en la leche con calcio.

Palabras clave: leche de soja, calcio, micronización, estabilidad.

Abstract: The objective was to study the effect of refrigeration and freezing on the stability of soybean milk prepared by micronization from defatted flour, in absence and presence of calcium. After refrigeration for 1 day, the soymilk with calcium showed a lower particle size and a higher apparent viscosity than the sample without calcium, attributed to the formation of protein aggregates in presence of the cation. Refrigeration for 9 days produced an increase in the particle size of both soymilks, without an appreciable effect on the homogeneity of the systems. The rheology of the soymilk without calcium was neither affected and the sample fortified with the cation only showed a mild decrease in its viscosity, probably because of the formation of more compact and less hydrated aggregates with lower interaction between them. On the other hand, freezing for 1 day produced much higher particle sizes than the previous treatment, attributed to a higher protein aggregation degree, and high destabilization of both systems with important increase of particle size was observed after 9 days. This effect was more pronounced in the soymilk with calcium.

Keywords: soybean milk, calcium, micronization, stability.

INTRODUCCIÓN

La leche de soja es una bebida muy nutritiva, libre de colesterol y lactosa, y con igual o mayor contenido de proteínas que la leche de vaca. Tradicionalmente se prepara a partir de los granos enteros de soja eliminando gran parte de la fibra, pero hay métodos alternativos de preparación de leche de soja a partir de harina desgrasada. Una de las desventajas de la leche de soja frente a la leche vacuna es que su contenido en calcio es considerablemente menor: 20-30 mg Ca^{2+}/100 mL versus 120 mg Ca^{2+}/100 mL (Chaiwanon *et al.* 2000). Desde el punto de vista tecnológico, la dificultad de incorporar calcio a la leche de soja a niveles de la leche vacuna se debe a la interacción de este catión con las proteínas, los fosfolípidos y la fibra (Appu Rao y Narasinga Rao 1975, Whittinghill *et al.* 2000, Wagner y Tomás 2007, Pathomrungsiyounggul *et al.* 2007). Debido a esto, con un tratamiento térmico aun suave como una pasteurización, las proteínas de la soja coagulan por formación de agregados insolubles, en los que participan también las fibras, produciendo la desestabilización de la leche por sedimentación de los mismos en la parte inferior del recipiente. Trabajos de otros autores mostraron que es posible formular una leche de soja térmicamente estable con alto contenido de calcio, adecuando los niveles de citrato y fosfato como agentes quelantes del catión (Yazici *et al.* 1997, Pathomrungsiyounggul *et al.* 2010). El presente trabajo propone una solución alternativa que consiste en la

micronización de los agregados formados debido a la fortificación de la leche de soja con una sal de calcio soluble.

Trabajos previos estudiaron el efecto de la congelación sobre la leche de soja, obteniéndose coágulos tipo gel similares al tofu (queso de soja) o yogurt (Shimoyamada *et al.* 1999a,b, 2000). Más recientemente se estudió la estabilidad de emulsiones o/w preparadas con aislados de soja o caseinato de sodio frente a la congelación (Palazolo y Wagner 2007, Palazolo *et al.* 2011). Se observó que las emulsiones preparadas con proteínas de soja como único agente emulsificante son poco estables al ser congeladas, requiriendo el uso de crioprotectores (azúcares y polialcoholes) para incrementar su estabilidad. La fortificación de la leche de soja con calcio amplia el campo de estudio de la estabilidad del sistema frente al almacenamiento refrigerado y congelado.

El objetivo de este trabajo fue obtener una leche de soja preparada a partir de una harina desgrasada mediante la micronización del sistema en ausencia y presencia de calcio libre añadido, a fin de estudiar el efecto de la refrigeración y la congelación sobre su estabilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Pellet desgrasado de soja con proteínas nativas (provisto por Bunge Argentina S.A.; Puerto San Martín, Argentina); agua destilada; aceite de girasol refinado (Molino Cañuelas SACIFIA; Cañuelas, Argentina); cloruro de calcio anhidro (Anedra; San Fernando, Argentina).

La composición del pellet desgrasado (g/100 g) fue la siguiente: proteínas (N×6,25): 43,6 ± 0,9 (Micro-Kjeldahl con colorimetría final; Nkonge y Murray-Ballance 1982); humedad (secado en estufa a presión normal y 103 ± 2 °C, hasta peso constante): 8,36 ± 0,08; y cenizas (calcinación a 550 ± 5 °C): 6,45 ± 0,03. El contenido de lípidos totales en el pellet fue menor al 1%, según lo declarado por el proveedor.

Preparación de las leches de soja fluidas

La harina de soja desgrasada (HSD) fue obtenida a partir del pellet desgrasado por molienda (Molino Chincan modelo FW100; China) y posterior tamizado (tamiz N° 20, IRAM 1501/76-ASTM-E-11-81, 500 μm de poro). La HSD se dispersó en agua destilada a una concentración de 7,5% $^{P}/_{P}$ de sólidos totales utilizando un agitador magnético durante 3 horas para asegurar la completa dispersión e hidratación. La dispersión se trató térmicamente en baño en ebullición durante 40 minutos con el fin de inactivar los factores antinutricionales (factor antitríptico de Kunitz y lectina) presentes en la harina. El calentamiento se realizó en ausencia y presencia de cloruro de calcio (120 mg Ca^{2+}/100 g), observándose visualmente mayor coagulación cuando el catión fue añadido. Posteriormente se agregó de aceite de girasol (2,5% $^{P}/_{P}$) y se pre-homogeneizó la mezcla con un dispositivo rotor-estator Utraturrax T-25 (IKA-Labortechnik; Staufen, Alemania) usando un rotor S25-20NK-18G (IKA-Labortechnik; Staufen, Alemania) a 20000 rpm por 1 min. La emulsión obtenida fue pasada con un homogeneizador a válvula de alta presión (Panda 2K, GEA Niro Soavi; Parma, Italia) a 1200 bar. Finalmente la leche de soja fue sometida a una pasteurización (75 ºC durante 1 min).

Almacenamiento refrigerado y congelado

Las leches de soja obtenidas fueron almacenadas en heladera a 7 ºC y en freezer a -18 ºC durante 1 y 9 días en ambos casos. La descongelación de las muestras para su posterior caracterización se realizó a temperatura ambiente.

Distribución de tamaño de partícula

Las distribuciones de tamaño de partícula (DTP) de las leches de soja fueron obtenidas con un analizador de partículas (Malvern Mastersizer 2000E, Malvern Instruments Ltd.; Workcestershire, Reino Unido). Las muestras fueron levemente agitadas para su homogeneización antes de la medición y diluidas en agua en la unidad de dispersión húmeda (Hydro 2000MU, Malvern Instruments Ltd.; Workcestershire, Reino Unido) a una velocidad de 2000 rpm. Los parámetros ópticos seleccionados en el dispositivo para la transformación de los patrones de difracción de luz en las correspondientes DTP fueron: índice de refracción del agua y la fase dispersa: 1,33 y 1,52, respectivamente y coeficiente de absorción, 0,01. Los diámetros de partícula promedio d_{32} y d_{43} se obtuvieron a partir de las DTP expresadas como superficie (%) y volumen (%), respectivamente.

Cabe destacar que los diámetros obtenidos son aparentes puesto que se determinan aquellas partículas que permanecen estables en las condiciones de alta dilución y agitación durante las medidas (Thanasukarn *et al*. 2004).

Reología

El comportamiento de flujo de las leches de soja fue estudiado con un reómetro AR-G2 (TA Instruments; New Castle, EE.UU.) con una geometría cono-plato (espacio entre plato y cono, 55 µm; diámetro de cono, 40 mm; ángulo de cono, 2º). La temperatura (21 ºC) se controló con un baño de agua (Julabo ACW100, Julabo Labortechnik; Seelbach, Alemania) asociado al reómetro. El comportamiento de flujo fue analizado aumentando la velocidad de corte de 0,1 a 100 s^{-1} durante 310 s, luego manteniéndola constante a 100 s^{-1} durante 60 s y finalmente disminuyéndola de 100 a 0,1 s^{-1} durante 310 s. El experimento fue descartado para aquellas muestras que se encontraron altamente desestabilizadas, debido a su heterogeneidad.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado por análisis de varianza y la prueba de mínima diferencia significativa ($P < 0,05$) utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphic Corporation, EE.UU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la refrigeración

En la **Figura 1** pueden observarse las DTP expresadas como volumen (%) de las leches de soja con y sin calcio añadido, sometidas a refrigeración durante 1 y 9 días. En estas muestras, las partículas capaces de dispersar luz son una conjunción de aceite, fibra y proteína insoluble. Luego de 1 día de almacenamiento, en ambas leches se observó una población mayoritaria y definida de partículas con modas entre los 20 y 40 µm, atribuible a las partículas de fibra hidratadas, ya que la micronización en las condiciones realizadas asegura que tanto las proteínas insolubles como las gotas de aceite tengan tamaños menores a 5 µm. Sin embargo, la presencia de calcio produjo un sistema con mayor cantidad relativa de partículas más pequeñas, lo cual se manifiesta en un menor valor de d_{32} y d_{43} (**Tabla 1**). El calcio, al unirse a las proteínas de soja, fundamentalmente a la glicinina, favorece la formación de agregados proteicos por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Appu Rao y Narasinga Rao 1975, Pathomrungsiyounggul *et al.* 2010). Por lo tanto el resultado observado podría atribuirse al aumento de la cantidad de proteína insoluble en presencia del catión y a cierto grado de floculación de gotas de aceite (por interacción de las interfases proteicas que las rodean), surgiendo una nueva población de partículas más pequeñas que las de las fibras. Por su parte, la refrigeración durante 9 días produjo aumentos significativos de los valores de d_{43} de ambas leches en comparación con la leche almacenada durante 1 día (**Tabla 1**), lo cual podría deberse a la formación de agregados proteína-fibra inducida por la baja temperatura de almacenamiento. De todas maneras, el carácter de las distribuciones no se vio afectado considerablemente (**Figura 1**) y la apariencia visual de las leches se mantuvo homogénea.

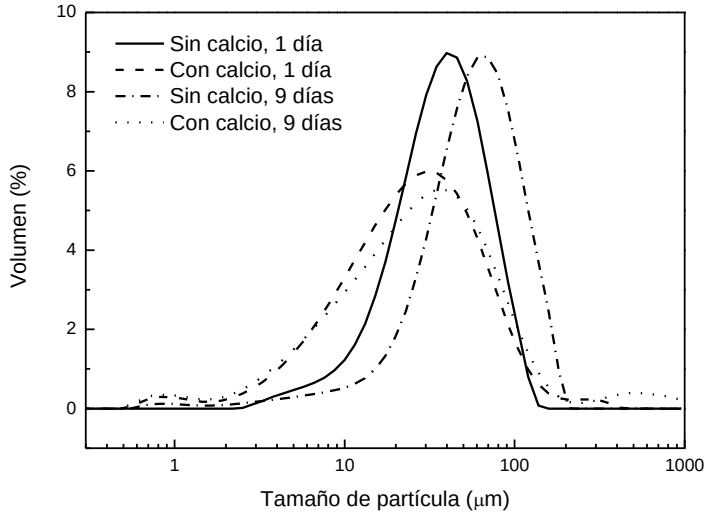


Figura 1: Distribución de tamaño de partícula de leches de soja con y sin calcio añadido, almacenadas a 7 ºC durante 1 y 9 días.

Tabla 1: Tamaños de partícula promedio (d_{32} y d_{43}) de leches de soja con y sin calcio añadido, almacenadas a 7 ºC durante 1 y 9 días.

Muestra	d_{32} (µm)		d_{43} (µm)	
	1 día	9 días	1 día	9 días
Sin calcio	24,8 ± 0,7 [b]	26,1 ± 0,6 [c]	40,5 ± 2,5 [b]	59,5 ± 1,4 [d]
Con calcio	11,5 ± 0,2 [a]	11,1 ± 0,3 [a]	32,9 ± 0,8 [a]	49,7 ± 1,0 [c]

Los valores son medias de tres replicados ± desviación estándar.
Medias con letras diferentes indican que hay diferencias significativas entre muestras ($P < 0,05$).

El comportamiento de flujo de las leches de soja refrigeradas puede observarse en la **Figura 2**. En todos los casos se observó un comportamiento pseudoplástico, de acuerdo a la forma en que el esfuerzo de corte aumenta con la velocidad de corte en la primera etapa del experimento. También se observó un comportamiento tixotrópico en todas las muestras, reflejado por la disminución del esfuerzo de corte en la etapa de velocidad de corte constante; y en la última etapa, donde se diminuyó la velocidad de corte, los valores de esfuerzo de corte fueron menores que los de la primera etapa. Estos resultados indican una disminución de la viscosidad aparente que puede ser atribuida a la disrupción de estructuras y agregados dados por la interacción entre las partículas presentes en las leches (proteínas, gotas de aceite, fibra) en las condiciones de flujo aplicadas. Por su parte, la adición de calcio produjo un sistema con mayores valores de esfuerzo de corte, indicando una mayor viscosidad. Dado que la presencia del catión llevaría a la insolubilización de proteína por formación de agregados, la muestra con calcio añadido dispondría de mayor cantidad de partículas que interaccionan entre sí, repercutiendo en el comportamiento de flujo del sistema (Pathomrungsiyounggul *et al.* 2010). La formación de flóculos inducida por la presencia de calcio también puede ser responsable del aumento de viscosidad. En cuanto al efecto del tiempo de almacenamiento, a los 9 días no se observaron cambios reológicos apreciables en la leche sin calcio y hubo una disminución del 20% en la viscosidad aparente (determinada a un tiempo de 100 s) de la muestra con el catión añadido (**Figura 2**). Aunque como se mencionó anteriormente en ambas leches habría habido aumento de agregación de proteínas con el tiempo de refrigeración, los nuevos agregados podrían ser más compactos y menos hidratados, teniendo menor interacción entre sí. La menor interacción entre partículas explicaría la disminución de la viscosidad en la leche con calcio, donde el efecto de las bajas temperaturas en la compactación de los agregados sería mayor.

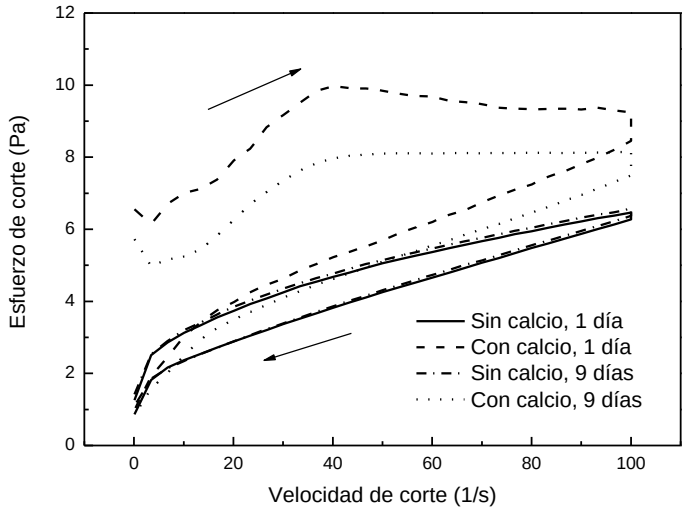


Figura 2: Comportamiento de flujo de leches de soja con y sin calcio añadido, almacenadas a 7ºC durante 1 y 9 días.

Efecto de la congelación

La **Figura 3** muestra las DTP de las leches de soja sometidas a congelación durante 1 y 9 días, con y sin calcio añadido. Las muestras congeladas durante 1 día mostraron distribuciones bimodales bien definidas y tamaños de partícula considerablemente mayores que los de las muestras refrigeradas (**Tabla 2**), atribuidos a

una mayor agregación de proteínas y fibras por la congelación del agua. Cuando una emulsión se almacena a temperaturas donde se produce la cristalización del agua, los componentes de la fase dispersa (gotas de aceite y proteínas ya insolubilizadas) son forzados a permanecer en la fase acuosa no congelada. Además, la crio-concentración de componentes solubles de la fase acuosa, como las sales propias que aporta la harina, producen un considerable incremento de la fuerza iónica. Estos efectos se combinan favoreciendo la floculación y/o coalescencia de las gotas de aceite y un mayor grado de agregación proteica (McClements 2004). La leche con calcio presentó una mayor población de partículas más pequeñas que la muestra sin el catión añadido debido a la presencia de proteína insolubilizada, lo cual se ve reflejado en un menor valor de d_{32} (**Tabla 2**). Al mismo tiempo, la presencia de calcio produjo un valor de moda mayor en la población de partículas más grandes, dado que los agregados formados en este caso serían de mayor tamaño por la interacción del catión con las proteínas; por tal motivo los valores de d_{43} de ambas muestras se igualan a pesar de la evidente diferencia en el carácter de sus DTP. La crio-concentración del catión en la fase acuosa durante el almacenamiento congelado tiene un rol preponderante en la formación de los agregados de mayor tamaño en la leche con calcio añadido. Luego de 9 días de almacenamiento, en ambas leches se observó un aumento en el tamaño y la cantidad de partículas más grandes a expensas de la disminución de la población de partículas más pequeñas (**Figura 3**), lo cual se vio manifestado en un aumento de los valores de d_{32} y d_{43} (**Tabla 2**). Este resultado se atribuye a la extensiva agregación de proteínas sumada a la posible floculación/coalescencia de gotas de aceite, durante el tiempo de congelación (Palazolo *et al.* 2011), y este efecto fue más pronunciado en la leche con calcio añadido.

Con respecto al efecto de la congelación sobre el comportamiento de flujo de los sistemas, la leche sin calcio añadido y congelada durante 1 día mostró una disminución del 50% en su viscosidad aparente (determinada a un tiempo de 100 s) en comparación con la refrigeración durante el mismo tiempo. Como se explicó anteriormente, la generación de agregados más compactos y menos hidratados, en este caso debido a la congelación, produciría una disminución en la viscosidad del sistema por una menor interacción entre las partículas. El proceso de coalescencia genera también una reducción del número de gotas de aceite, pudiendo ser otro motivo al cual se debe la disminución de viscosidad. En el caso de la leche con calcio, la congelación durante 1 día dio como resultado un sistema heterogéneo tras su descongelación, manifestado por su alto grado de agregación (**Figura 3**); esta avanzada desestabilización de la muestra no permitió determinar su comportamiento de flujo. Asimismo, luego del almacenamiento durante 9 días ambas leches evidenciado un grado desestabilización aún mayor, producto de un tratamiento más prolongado de congelación.

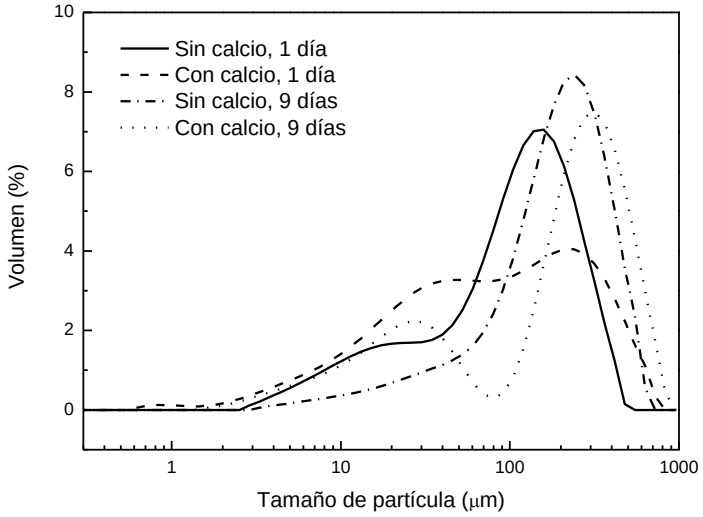


Figura 3: Distribución de tamaño de partícula de leches de soja con y sin calcio añadido, almacenadas a -18ºC durante 1 y 9 días.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que las leches de soja preparadas mediante micronización tuvieron una aceptable estabilidad frente al almacenamiento refrigerado, observándose cambios moderados en la microestructura de los sistemas y una leve disminución en la viscosidad de la muestra con calcio añadido, ya

de por sí más viscosa. La congelación produjo cambios mucho más importantes, llevando a una alta desestabilización de los sistemas luego del almacenamiento prolongado. Los resultados de este trabajo muestran que la micronización de los agregados formados durante la etapa de cocción de la leche de soja es un método prometedor para la obtención de esta bebida fortificada con calcio al nivel de la leche vacuna y con buena estabilidad durante la refrigeración. Para obtener una leche de soja fortificada con calcio que sea estable frente a la congelación podría evaluarse el uso combinado de agentes crioprotectores (azúcares, polialcoholes, etc.) y sales que aporten menor cantidad de calcio libre que el cloruro (lactato, gluconato, etc.).

Tabla 2: Tamaños de partícula promedio (d_{32} y d_{43}) de leches de soja con y sin calcio añadido, almacenadas a -18 ºC durante 1 y 9 días.

Muestra	d_{32} **(µm)**		d_{43} **(µm)**	
	1 día	**9 días**	**1 día**	**9 días**
Sin calcio	$37,5 \pm 0,4^{b}$	$73,2 \pm 6,1^{c}$	$117,9 \pm 1,6^{a}$	$194,0 \pm 5,5^{b}$
Con calcio	$22,1 \pm 0,2^{a}$	$35,4 \pm 1,6^{b}$	$128,8 \pm 1,0^{a}$	$219,5 \pm 11,0^{c}$

Los valores son medias de tres replicados ± desviación estándar. Medias con letras diferentes indican que hay diferencias significativas entre muestras ($P < 0,05$).

BIBLIOGRAFÍA

Appu Rao AG, Narasinga Rao MS. 1975. Binding of Ca (II) by the 11S fraction of soybean proteins. Cereal Chemistry, 52: 21-33.

Chaiwanon P, Puwastien P, Nitithamyong A, Sirichakwal PP. 2000. Calcium fortification in soybean milk and in vitro bioavailability. Journal of Food Composition and Analysis, 13: 319-327.

McClements DJ. 2004. Protein-stabilized emulsions. Current Opinion in Colloid and Interface Science, 9: 305-313.

Nkonge C, Murray-Ballance G. 1982. A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in Micro-Kjeldahl digests. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 30: 416-420.

Palazolo GG, Wagner JR. 2007. Effect of freezing on stability of soy protein and sodium caseinate oil-in-water emulsions. En: Lupano CE, editor. Functional properties of food components. Kerala: Research Signpost. pág 33-56.

Palazolo GG, Sobral PA, Wagner JR. 2011. Freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions prepared with native and thermally-denatured soybean isolates. Food Hydrocolloids, 25: 398-409.

Pathomrungsiyounggul P, Grandison AS, Lewis MJ. 2007. Effects of calcium chloride and sodium hexametaphosphate on certain chemical and physical properties of soymilk. Journal of Food Science, 72: 428-434.

Pathomrungsiyounggul P, Lewis MJ, Grandison AS. 2010. Effects of calcium-chelating agents and pasteurisation on certain properties of calcium-fortified soy milk. Food Chemistry, 118: 808-814.

Shimoyamada M, Tômatsu K, Oku S, Watanabe K. 2000. Interactions among protein molecules in freeze-gel of soymilk and protein structures in heated soymilk during cooling. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 2775-2779.

Shimoyamada M, Tômatsu K, Watanabe K. 1999a. Insolubilisation and gelation of heatfrozen soymilk. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79: 253-256.

Shimoyamada M, Tômatsu K, Watanabe K. 1999b. Effect of precooling step on formation of soymilk freeze-gel. Food Science and Technology Research, 5: 284-288.

Thanasukarn P, Pongsawatmanit R, McClements DJ. 2004. Influence of emulsifier type on freeze-thaw stability of hydrogenated palm oil-in-water emulsion. Food Hydrocolloids, 18: 1033-1043.

Wagner JR, Tomás MC. 2007. Influence of pH-calcium relationship on soybean proteins-lecithin interaction and stability of oil in water (o/w) emulsions. En: Lupano CE, editor. Functional properties of food components. Kerala: Research Signpost. pág 23-31.

Whittinghill JM, Norton J, Proctor A. 2000. Stability determination of soy lecithin-based emulsions by Fourier transform infrared spectroscopy. Journal of the American Oil Chemists' Society, 77: 37-42.

Yazici F, Alvarez VB, Mangino ME, Hansen PMT. 1997. Formulation and processing of a heat stable calcium-fortified soy milk. Journal of Food Science, 62: 535-538.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el aporte financiero de la Universidad Nacional de Quilmes (Programa I+D PUNQ 53/1007). G. N. Salvatore y R. G. Otero son estudiantes de Ingeniería en Alimentos de la Universidad Nacional de Quilmes y A. L. Márquez, J. R. Wagner y G. G. Palazolo son investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Propiedades físicas y térmicas de películas comestibles en base a proteínas de suero de queso

Michaluk, A. [1]; Romero, A. [1]; Judis, M.A. [1]; Bertola, N. [2]

1: Universidad Nacional del Chaco Austral, Argentina
2: Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina
nbertola@cidca.org.ar

Resumen: Se estudió el efecto de las concentraciones de proteínas y glicerol sobre las propiedades mecánicas, el color, la humedad, la solubilidad y la temperatura de transición vítrea de películas comestibles en base a proteínas de suero de queso.
Se seleccionaron tres concentraciones de proteína (6, 8 y 10% p/p) y tres de glicerol como plastificante (30, 60 y 90 % p/p proteína). Las películas se prepararon por moldeo y secado. La solubilidad se determinó en agua a 30°C por 22 hs. La temperatura de transición vítrea (Tg) se halló mediante un calorímetro diferencial de barrido (DSC) Q100. Para evaluar las propiedades mecánicas se realizaron ensayos de tensión-deformación para la determinación de la elongación antes de la ruptura y el módulo elástico de las diferentes películas mediante análisis dinámico-mecánico (DMA). El color superficial se determinó a través de los parámetros de cromaticidad a* y b* y la luminosidad.
Las películas obtenidas sin glicerol resultaron muy quebradizas y no pudieron ser desmoldadas. Cuando se agregó plastificante se obtuvieron películas flexibles, transparentes y ligeramente amarillas. Los valores de humedad y solubilidad aumentaron con el incremento de los niveles de glicerol. Se obtuvieron valores de Tg para las películas con glicerol, entre 33º y 34ºC. El aumento en la concentración de proteínas produjo un aumento en b* y en la deformación antes de la ruptura y una reducción del modulo elástico.

Palabras clave: películas, proteína de suero de queso, glicerol, propiedades mecánicas, Tg

Abstract: The objective of this work was to study the effect of concentrations of protein and glycerol on the mechanical properties, color, moisture, solubility and glass transition temperature of edible films based on whey proteins.
Three protein concentrations (6, 8 and 10% w / w) and three glycerol concentrations as plasticizer (30, 60 and 90% w / w protein) were selected. The films were prepared by casting and drying. The solubility was determined in water at 30 ° C for 22 hours. The Tg was determined using a DSC Q100. To evaluate the mechanical properties were carried out stress-strain tests for the determination of the elongation before rupture and elastic modulus of the different films in a DMA. The surface color was determined by the chromaticity parameters a* and b* and luminosity.
The films obtained without glycerol were very brittle and could not be demoulded. When added plasticizer flexible, transparent and slightly yellow films were obtained. DSC showed lower values of Tg with increasing plasticizer concentration. The increase in protein concentration produced an increase in b* and deformation before rupture and reduced elastic modulus.

Keywords: film, whey protein, glycerol, mechanical properties, Tg

INTRODUCCIÓN

La tecnología de los recubrimientos comestibles surge como una alternativa prometedora para mejorar la calidad y conservación de alimentos durante su procesado y/o almacenamiento. Los recubrimientos ofrecen la posibilidad de consumirse con el alimento, extienden su vida útil ya que retardan la migración de humedad y de lípidos, así como el transporte de solutos y aromas, mejoran las características organolépticas, nutricionales y las propiedades mecánicas del alimento. Además, conservan la textura y permiten incorporar nutrientes y/o aditivos (Kester y Fennema, 1986). Técnicamente, se habla de recubrimiento cuando una solución aplicada sobre un producto forma una película superficial al secarse, mientras que una película se forma con anterioridad y posteriormente se aplica sobre el producto. En la práctica, se habla indistintamente de película o recubrimiento, haciendo referencia a una delgada capa de material que cubre la superficie del alimento, aplicada mediante inmersión, pulverización o pintado, o bien como una envoltura continua que

separa distintos componentes alimenticios, que puede ser consumida como parte del producto (Guilbert 1986; Gennadios y Weller 1990).
Muchos polisacáridos y proteínas tienen buenas propiedades de formación de película (Gennadios y Weller 1990; McHugh y Krochta 1994). Se pueden usar solos o en combinación, con el objeto de mejorar sus propiedades. Las películas producidas a partir de proteínas y polisacáridos presentan buenas propiedades de barrera al oxígeno y a la migración de lípidos. Sin embargo, su naturaleza hidrofílica las hace pobres barreras al vapor de agua (McHugh y Krochta 1994).
Las proteínas del suero de queso producen películas transparentes, blandas y flexibles, con muy buena resistencia a la transferencia de oxígeno, volátiles y lípidos a humedades bajas. Sin embargo, la naturaleza hidrofílica de las proteínas induce interacciones con el agua, aumentando la permeabilidad al vapor de agua. El suero lácteo se obtiene como subproducto en la elaboración del queso y su eliminación suele resultar problemática desde el punto de vista medioambiental. De hecho, se investigan diversas alternativas que permitan su aprovechamiento, una de ellas es la utilización de sus proteínas en la formulación de películas biodegradables y recubrimientos comestibles en alimentos.
Algunos de los recubrimientos requieren la incorporación de agentes plastificantes, los cuales ayudan a mantener su integridad y aumentan la flexibilidad y la resistencia a la rotura (Carrillo-López *et al*. 2000). Estos compuestos disminuyen las fuerzas intermoleculares en las cadenas del polímero produciendo un descenso en las fuerzas de cohesión y por tanto, imparten movilidad molecular a la matriz, plastificándola. Como consecuencia, aumenta el volumen libre y disminuye la temperatura de transición vítrea, afectando significativamente sus propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua. La relación entre las concentraciones de polímero y plastificante resulta ser, por lo tanto, un parámetro clave para determinar las propiedades funcionales de una película. Entre los plastificantes más utilizados se encuentran mono-, di- y oligosacáridos (jarabes de glucosa y fructosa, miel) y polioles (sorbitol, glicerol, derivados de la glicerina y polietilenglicol) (Guilbert 1986), siendo el agua el plastificante natural de los productos alimenticios. Los requerimientos para un plastificante son su compatibilidad con el polímero formador de la red y su permanencia dentro de la estructura (García *et al*. 1998).
En este trabajo se estudió el efecto de las concentraciones de proteínas y glicerol (plastificante) sobre las propiedades mecánicas, el color, la humedad, la solubilidad y la temperatura de transición vítrea de películas comestibles en base a proteínas de suero de queso.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de las películas

Se utilizó proteína de suero de queso concentrada (WPC) Lacprodan 80 (ARLA Foods Ingredients, Porteña, Cordoba) y glicerol (Cicarelli, Santa Fe).
Las películas de WPC se prepararon de acuerdo al método descripto por Perez-Gago y Krochta (2000) con algunas modificaciones. Para preparar las soluciones filmogénicas de diferentes concentraciones (6, 8 y 10%) se dispersó WPC en agua destilada con agitación constante durante 2 h. Las soluciones obtenidas fueron desgaseadas por medio de vacío, se ajustó el pH a un valor de 7 por medio de Na(OH) 1N y fueron desnaturalizadas térmicamente en baño de agua a 80ºC por 30 min. Se agregó el glicerol como plastificante en diferentes concentraciones (30, 60 y 90% respecto al contenido de proteína). Cada experimento se realizó por triplicado.
Aproximadamente 20 g de cada solución con y sin plastificante se dispersaron en placas de Petri (9 cm de diámetro) y se secaron a 25 °C hasta peso constante. Las películas obtenidas se almacenaron a 23 °C y 650% de humedad relativa. El espesor de las películas se determinó utilizando un medidor de espesor DCN-900 (Nueva York, EE.UU.) para materiales no conductores sobre sustratos no ferrosos.

Caracterización de las películas

La determinación de los valores de humedad se realizó por el método de secado en estufa a 105°C hasta peso constante.
El ensayo de solubilidad se llevó a cabo a través de la inmersión de piezas de igual dimensión de cada una de las películas de WPC con las distintas concentraciones de plastificante, pesadas previamente, en agua destilada a 30°C. Luego de transcurrido un tiempo de hidratación de 22 hs, las películas se secaron sobre una superficie absorbente. El porcentaje de material soluble fue determinado por el método de secado en estufa a 105ºC, teniendo en cuenta el peso inicial de las muestras.

El color superficial se determinó con un colorímetro Minolta CR400 (Japón), obteniéndose los parámetros de cromaticidad a* y b* y la luminosidad (L).
Las propiedades térmicas de las películas se determinaron utilizando un DSC modelo Q100 controlado por un módulo TA 5000 (TA Instruments, New Castle, Delaware, EE.UU.). Aproximadamente 7 mg de muestra fueron pesados en cápsulas de aluminio y sellados herméticamente, una cápsula vacía se utilizó como referencia. Se realizaron dos análisis entre -60 y 110ºC con una velocidad de calentamiento de 10 ºC/min. A partir de los termogramas obtenidos se obtuvo la temperatura de transición vítrea (Tg) utilizando el programa de análisis Universal Analysis V1.7F software (TA Instruments).
Los análisis dinámico-mecánico (DMA) se realizaron en un equipo Q800 (TA Instruments, New Castle, EE.UU.), las película se cortaron con una geometría rectangular (30 mm de longitud, 6 mm de ancho y un espesor entre 85 y 110 μm). Las curvas de tensión- deformación se obtuvieron con una rampa de fuerza a velocidad de deformación constante hasta alcanzar una fuerza de 18 N o hasta la rotura de las muestras. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico
Se realizó un análisis de varianza (ANAVA) para evaluar el efecto de los factores analizados utilizando el programa Systat versión 12.0. Para los ensayos de comparación de medias se empleó el test de menor diferencia significativa (LSD) con $P > 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSION
A partir de las soluciones de WPC se obtuvieron películas delgadas de espesor aproximado entre 80 y 115 μm. Las obtenidas sin el agregado de glicerol resultaron muy quebradizas y no pudieron ser desmoldadas. Cuando se agregó glicerol como plastificante se obtuvieron películas flexibles, transparentes y ligeramente amarillas, resultando muy pegajosas las películas con el mayor contenido de glicerol.

Humedad y Solubilidad
Los valores obtenidos de humedad y solubilidad son mostrados en la **Figura 1,** donde se puede observar que a mayores niveles de glicerol se obtuvieron mayores valores de dichos parámetros. El aumento de la humedad observado puede atribuirse a la naturaleza higroscópica del glicerol que atrae y retiene moléculas de agua, favoreciendo así la humectación de la superficie de la película y por lo tanto la absorción de humedad (Kokoszka *et al.* 2010).
La solubilidad en agua de las películas comestibles es una propiedad importante. Posibles aplicaciones pueden requerir insolubilidad en agua para mejorar la integridad del producto, sin embargo, en algunos casos podría ser beneficiosa la solubilización de la película en agua antes del consumo del producto. La insolubilidad parcial de estas películas puede ser atribuida a la formación de enlaces intermoleculares fuertes (por ejemplo, enlaces disulfuro, como resultado del tratamiento térmico) entre las moléculas de proteína en la matriz de las películas de WPC (McHugh y Krochta 1994).

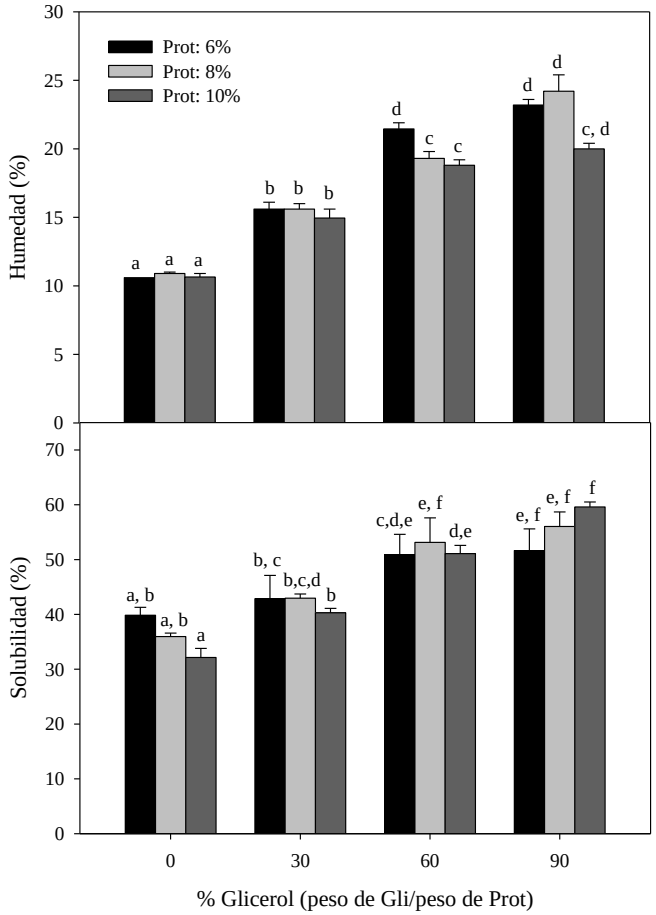


Figura 1. Variación de los valores de Humedad y Solubilidad con las concentraciones de proteína y glicerol (expresada respecto al contenido de proteína).

Color

El color es de vital importancia, ya que influye directamente en el atractivo del producto y la aceptación del consumidor.

La concentración de proteínas afectó significativamente el color de las películas produciendo un aumento en el parámetro b*, que representa el color amarillo. Los niveles de glicerol utilizados no afectaron significativamente a ninguno de los parámetros de color analizados.

Propiedades térmicas

Los resultados de DSC mostraron que las temperaturas de transición vítrea (Tg) de las películas fueron superiores a 30ºC existiendo diferencias significativas entre las muestras con y sin agregado de plastificante (**Figura 2**). La Tg disminuyó con el agregado del plastificante. Sin embargo no se observaron diferencias significativas en los valores de Tg entre las distintas concentraciones de glicerol estudiadas.

Las interacciones proteína-proteína y proteína-plastificante también pueden ser investigadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los termogramas obtenidos de las películas de proteína de suero de queso mostraron compatibilidad entre el polímero y el glicerol. No se hallaron picos relacionados con la fusión y la cristalización del plastificante y se detectó sólo una transición de fase. Si el polímero y el plastificante fueran inmiscibles, la mezcla presentaría dos Tg correspondientes a las dos fases puras (Ghanbarzadeh y Oromiehi 2009).

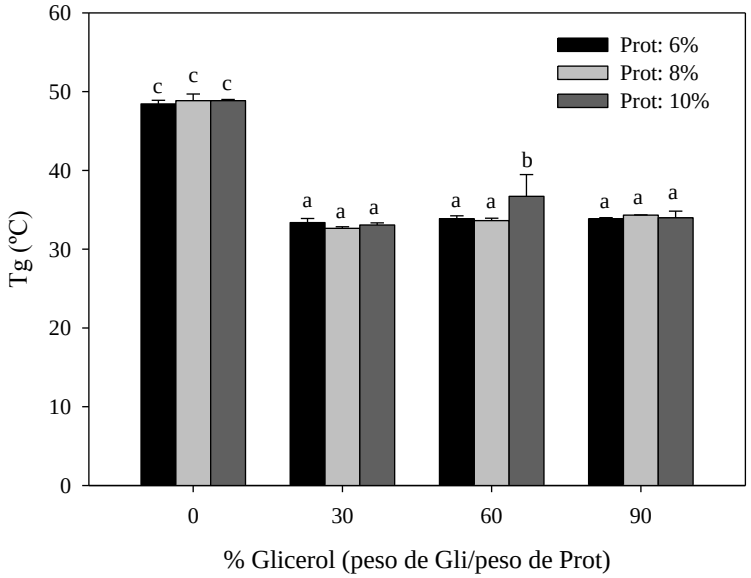


Figura 2. Variación de la Temperatura de Transición Vítrea (Tg) con las concentraciones de proteína y glicerol (expresada respecto al contenido de proteína).

Propiedades mecánicas

Según Mancini *et al.* (1999) y Del Nobile *et al.* (2007), un modelo matemático capaz de describir toda la curva de tensión-deformación se puede expresar como:

$$\sigma_T(\varepsilon_T) = E_C\,\varepsilon_T \exp(\varepsilon_T K) \quad (1)$$

donde ε_T es la tensión verdadera, σ_T el esfuerzo verdadero, Ec el módulo elástico y K una constante que permite ajustar el modelo.

Los datos de tensión-deformación, obtenidos para las películas de WPC con y sin glicerol, mostraron un adecuado ajuste al modelo propuesto con valores de r^2 mayores a 0.99 (**Figura 3**).

La **Figura 4** muestra los valores del módulo elástico obtenido para todas las películas. Las propiedades mecánicas solo fueron afectadas significativamente por los niveles del plastificante. El incremento de concentración de glicerol produjo un incremento en la deformación antes de la ruptura y una reducción del modulo elástico. Un comportamiento similar fue observado por Gupta *et al.* (2009) trabajando en tereftalato de polietileno (PET) a diferentes temperaturas y por León *et al.* (2008) sobre una matriz de gelano.

Según Barreto *et al.* (2003), un aumento en el contenido de glicerol incrementa la elasticidad y la elongación de la película debido a que limita la creación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas de proteína, incrementando así el espacio intermolecular y por lo tanto la movilidad de las cadenas.

CONCLUSIONES

A través de diferentes técnicas, se pudo comprobar que la relación entre las concentraciones de polímero y plastificante resulta ser un parámetro clave para determinar las propiedades de las películas en base a proteínas de suero de queso.

El agregado de glicerol mejoró las propiedades mecánicas de las películas haciéndolas más deformables a iguales valores de esfuerzo aplicado.

Una mayor concentración de proteína permitió obtener películas más resistentes a la tracción, obteniéndose mayores valores de la tensión máxima.

Se determinó una concentración máxima de glicerol a ser utilizada de 60% (respecto al contenido de proteína)

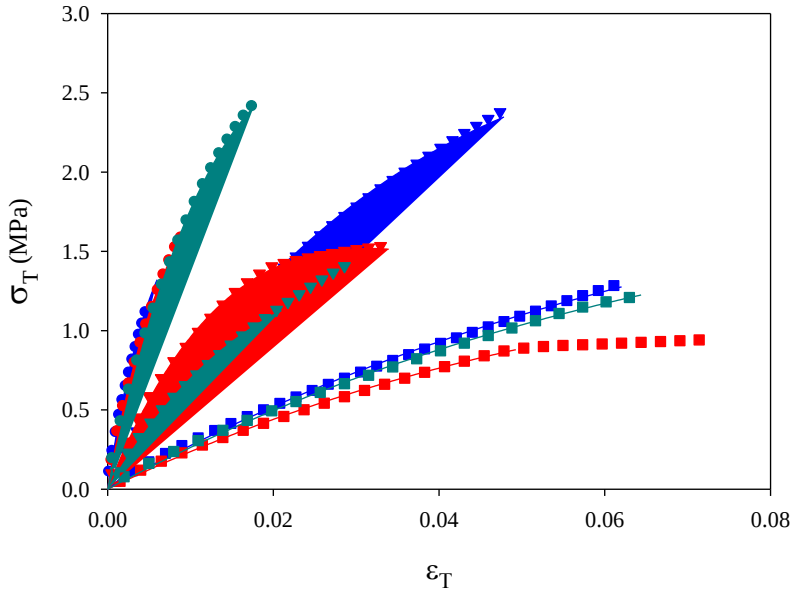


Figura 3. Curvas de tensión – deformación de películas de proteína de suero de queso con el agregado de glicerol. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y las líneas al modelo
• Glicerol 30%, ▼ Glicerol 60%, ■ Glicerol 90%. Rojo = Proteína 6%, Verde = Proteína 8%, Azul = Proteína 10%.

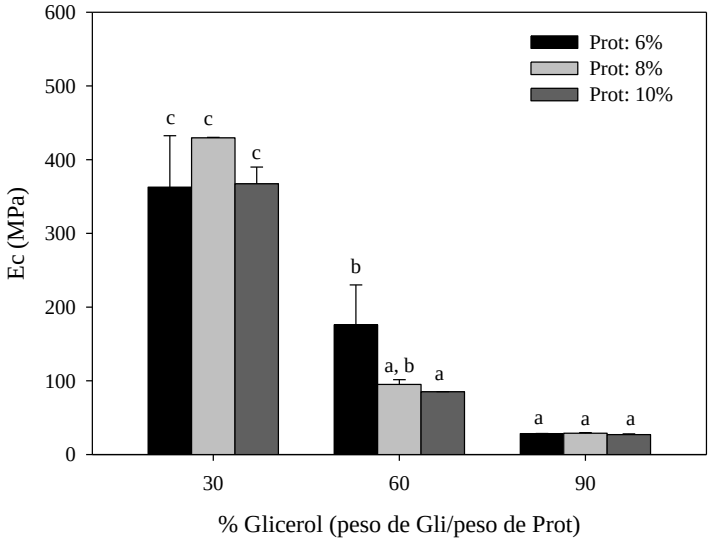


Figura 4. Valores del módulo elástico (Ec) en función de las concentraciones de proteína y glicerol (expresada respecto al contenido de proteína).

BIBLIOGRAFÍA

Barreto PL, PiresATN, Soldi V. 2003. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. Polymer Degradationand Stability, 79: 147-152.

Carrillo-Lopez, Ramirez-Bustamante, Valdez-Torres, Rojas-Villegas, Yahia. 2000. Ripening and quality changes in mango fruit as affected by coating with an Edible Film, Journal of Food Quality, 23: 479-486.

Del Nobile MA, Chill S, Mentana A, Baiano A. 2007. Use of the generalized Maxwell model for describing the stress relaxation behavior of solid-like foods, Journal of Food Engineering, 78, 978–983.

García MA, Martino MN, Zaritzky NE. 1998. Plasticizer effect on starch-based coatings applied to strawberries (*Fragaria×ananassa*), Journal of Agriculture Food and Chemistry, 46: 3758-3767.

Gennadios A, Weller CL. 1990. Edible films and coatings from wheat and corn proteins, Food Technology, 44: 63-69.

Ghanbarzadeh B, Oromiehi AR. 2009. Thermal and mechanical behavior of laminated protein films, Journal of Food Engineering, 90: 517–524.
Guilbert S. 1986. Technology and application of edible protective films. En: Mathlouthi, M. (ed.). *Food Packaging and Preservation. Theory and Practice.* Ed. Elsevier Applied Science Publishers, New York, USA, Pp. 371-394.
Gupta S, Dixit, Sharma K, Saxena NS. 2009. Mechanical study of methallized polyethylene terephthalate (PET) films, Surface & Coatings Technology, 204: 661-666.
Kester JJ, Fennema OR. 1986. Edible films and coatings: A review. Food Technology**,** 40: 47-59.
Kokoszka S, Debeaufort F, Lenart A, Voilley A. 2010. Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films, International Dairy Journal, 20: 53-60.
León P, Lamanna M, Gerschenson L, Rojas A. 2008. Influence of composition of edible films based on gellan polymers on L-(+)-ascorbic acid stability. Food Research International. 41: 667-675.
Mancini M, Moresi M, Rancini R. 1999. Mechanical properties of alginate gels: empirical characterization. Journal Food Engineering. 39:369-378.
McHugh TH, Krochta JM. 1994. Plasticited whey protein edible films: water vapor permeability properties, Journal of Food Science, 59: 416-423.
Pérez-Gago M, Krochta, J. 2000. Drying temperatura effect on water vapour permeability and mechanical properties of whey protein-lipid emulsion films, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49:2308-2312

AGRADECIMIENTOS
Los autores agradecen la financiación suministrada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Universidad Nacional de la Plata y la Universidad Nacional del Chaco Austral, Argentina.

Películas biodegradables e inteligentes en base a gelatina capaces de detectar cambios de pH

Musso Y.S., Salgado P.R., Mauri A.N.

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, CONICET, UNLP), La Plata, Argentina.
yanimusso@hotmail.com

Resumen: El objetivo de este trabajo es desarrollar películas biodegradables inteligentes de matriz proteica, capaces de detectar procesos de deterioro de alimentos asociados a cambios de pH. Se obtuvieron películas por *casting* a partir de dispersiones acuosas de gelatina comercial, glicerol e indicadores ácido-base –naranja de metilo (NM), rojo neutro (RN) y verde de bromocresol (VBC), a pHs: 2, 6 y 11. Todas las películas resultaron homogéneas y con diferentes coloraciones dependiendo del pH y del colorante empleado. Se evaluó la respuesta de estos materiales frente a cambios de pH simulando su contacto con: alimentos líquidos, alimentos semisólidos, y con el espacio de cabeza del envase a pHs ácido, neutro y alcalino. En todos los ensayos se observó que las películas respondieron frente a los cambios de pH del medio modificando su coloración. Por otro lado, la adición de NM y RN mejoró significativamente las propiedades mecánicas de las películas proteicas, sin afectar sus contenidos de agua y permeabilidades al vapor de agua. Estos materiales, usados como envases primarios o como etiquetas para pegar en la superficie interna de los envases primarios de alimentos cuyos mecanismos de deterioro sean acompañados por cambios de pH, podrían comunicarle al consumidor si el producto se encuentra apto para su consumo.

Palabras clave: envase inteligente, películas biodegradables, gelatina, cambios de pH, sensor de deterioro.

Abstract: The aim of this work was to develop smart biodegradable protein-based films capable of detecting food spoilage processes associated with changes in pH. Protein films were obtained by casting from aqueous dispersions of bovine gelatin, glycerol and acid-base indicators –methyl orange (NM), neutral red (RN) and bromocresol green (VBC)–, at pH 2, 6 and 11. All resulting protein films were homogeneous, and had different colors depending on pH and the indicator used. The response of these materials was evaluated simulating its contact with liquid foods, semi-solid foods, and with the container headspace; at acid, neutral and alkaline pH. In all tests, it was observed that protein films respond to changes in medium pH by modifying their color. Furthermore, the addition of NM and RN significantly improved mechanical properties of protein films without affecting its water vapor permeability values. These materials could be used as primary packaging or labels to be placed on the inner surface of food packaging, whose deterioration occurred with changes in pH. Thus they could indicate the consumer whether the product is suitable for consumption.
Keywords: smart packaging, protein films, gelatin, pH changes, food spoilage sensor.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha incrementado el interés en la producción y empleo de materiales biodegradables, obtenidos de fuentes renovables, para la preservación de alimentos (Restuccia *et al.* 2010). En particular, en los últimos años ha cobrado gran importancia el agregado de aditivos a la formulación de los materiales con el fin de conferirle al envase nuevas funciones (Brody *et al.* 2008). Así surgen los conceptos de "envases activos" y "envases inteligentes" (Dainelli *et al.* 2008).

Un envase inteligente es aquel capaz de detectar algunas de las propiedades del alimento envasado y/o del entorno e informar al productor, distribuidor o consumidor sobre el estado y la calidad del producto envasado, o modificar ciertas propiedades a fin de optimizar sus condiciones de conservación (Danielli *et al.* 2008). Los envases inteligentes pueden clasificarse en diferentes grupos de acuerdo a la función que cumplen; una de ellas es dar indicio de la calidad del producto (Kerry *et al.* 2006). Una buena alternativa para desarrollar envases inteligentes es utilizar aditivos que cambien de color en presencia de la sustancia indicadora de deterioro a cuantificar (por ejemplo: aminas, sulfuro de hidrógeno, etanol, toxinas, oxígeno, dióxido de carbono, dióxido de azufre, pH, ácidos orgánicos, etc.) (Ahvenainen 2003). Este tipo de envases resulta atractivo como estrategia para la realización de controles de calidad *in situ* y en productos cerrados. Algunos procesos de deterioro de alimentos van acompañados de cambios en el pH, como por ejemplo el

desarrollo de microorganismos (Kerry y Butler 2008). Por lo que un envase inteligente capaz de detectar cambios de pH podría utilizarse como indicador del desarrollo microbiano en alimentos envasados.
El *objetivo* de este trabajo fue desarrollar y caracterizar películas de matriz proteica, en base a gelatina, capaces de detectar cambios de pH. Para ello se evaluó el agregado a la formulación de indicadores ácido-base, de manera que indujeran cambios de coloración en la película frente a variaciones en el pH del medio con el que está en contacto el material.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó gelatina bovina comercial (87% de proteínas; "Royal", Kraft Foods, Argentina) como biopolímero y glicerol (Anedra, Argentina) como plastificante. Los indicadores ácido-base que se emplearon fueron: naranja de metilo (NM) (Mallinckrodt Baker, Estados Unidos), rojo neutro (RN) (Pablo Zubizarreta Ward, Argentina) y verde de bromocresol (VBC) (Anedra, Argentina). Todos los demás reactivos empleados fueron de grado analítico.

Formación de las películas

Se obtuvieron películas por *casting.* Se solubilizaron 5 g de gelatina en 50 ml de agua destilada a 100°C, y se mezclaron con 50 ml de una solución acuosa del colorante (20 mg) y glicerol (1,25 g) a temperatura ambiente. Se ajustó el pH a 2, 6 y 11, considerando el viraje de los indicadores ácido-base utilizados (Tabla 1). Las soluciones filmogénicas se agitaron 30 minutos a temperatura ambiente. Un volumen de 10 ml de cada solución se moldeó en placas de Petri (d=9 cm) y se secó en estufa de convección forzada (Yamato, DKN600, Estados Unidos) a 60°C durante tres horas. Las películas resultantes fueron acondicionadas 48 h a 20°C y 58%HR previo a su caracterización. Como control se obtuvieron películas de gelatina sin el agregado de indicadores a cada pH analizado.

Tabla 1: Coloración de los indicadores ácido-base utilizados en función del rango de pH.

Indicador ácido-base	Color	pH
Naranja de Metilo	Naranja	pH < 4
	Amarillo	4 < pH < 7
	Violeta	pH > 7
Rojo Neutro	Violeta	pH < 3,3
	Rojo	3,3 < pH < 7
	Amarillo	pH > 7
Verde de Bromocresol	Amarillo	pH <4
	Azul	pH >5,5

Caracterización de las películas

Espesor: Se determinó con un medidor de espesor digital (Check Line DCN-900, Estados Unidos), realizando 9 determinaciones, una en el centro y ocho sobre el perímetro de la película.
Humedad: El contenido de agua de las películas se determinó por secado en estufa a 105°C hasta lograr peso constante (ASTM D644-99, 2004). El procedimiento se realizó por triplicado.
*Solubilidad en agua: S*e determinó colocando tres discos de cada película (~2 cm de diámetro y previamente pesados) en 50 ml de agua destilada. Luego de 24 h de agitación a 100 rpm y 20°C se filtró la dispersión sobre papeles de filtro, previamente secados en estufa y tarados. Posteriormente, cada uno de los filtros se llevó a estufa a 105ºC, hasta peso constante, obteniendo así el peso seco de los sólidos insolubles. Teniendo en cuenta el contenido de humedad de las películas, se calculó el peso seco de los sólidos solubles, y así el porcentaje de solubilidad en agua. Las determinaciones se realizaron por triplicado.
Permeabilidad al vapor de agua: Se determinó según la norma ASTM E96-00 (2004). Las películas se colocaron en celdas de acrílico (con un área expuesta determinada) y se almacenaron a 20°C en jarras herméticas. Se mantuvo un gradiente de 75% de humedad relativa. Se registró el cambio en el peso de la celda en una balanza analítica en función del tiempo. Los datos se regresionaron linealmente y de la

pendiente se obtuvo la velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR, Water Vapour Transmission Rate). La permeabilidad al vapor de agua (WVP, Water Vapour Permeability) en (g Pa^{-1} s^{-1} m^{-1}) se calculó multiplicando la WVTR por el espesor de la película y dividiéndolo por la fuerza impulsora (1754,45 Pa) y el área expuesta de la película (~0,00185 m^2). Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.
Propiedades mecánicas: Las películas se sometieron a ensayos de tracción empleando un texturómetro (TA-XT2i, Stable Micro Systems, Inglaterra), siguiendo la norma ASTM D882-02 (2004). Se cortaron probetas rectangulares de 80 mm de longitud y 6 mm de ancho y se montaron en un sistema de mordazas para tensión A/TG, cuya separación inicial fue de 50 mm. Se aplicó una velocidad de separación de mordazas de 0,5 mm/s con una fuerza de 0,2 N, y se registró la curva fuerza vs. distancia, que luego se transformó en tensión (σ=fuerza/área transversal de la película) vs. deformación (ε=porcentaje de elongación respecto de la separación de mordazas). Se realizaron al menos nueve replicados para cada formulación.

Respuesta de las películas
Se evaluó la respuesta de las películas frente a cambios de pH enfrentando los materiales desarrollados a distintos medios:
i) agregando una gota de HCl 2 N o NaOH 2 N, directamente sobre los materiales, simulando el contacto con alimentos líquidos;
ii) poniendo las películas en contacto con geles de gelatina, preparados a partir de dispersiones de gelatina al 3% p/v a distintos pH = 2,5; 5,2; 7,5 y 11, a 4ºC; en este caso para simular el contacto con alimentos semisólidos;
iii) exponiendo los materiales proteicos a atmósferas gaseosas generadas por ácido acético glacial y amoníaco, para simular el contacto con el espacio de cabeza de alimentos envasados.
Estas respuestas se determinaron fotográficamente (Kodak M853, Estados Unidos) y registrando las coordenadas L^*, a^*, b^* de la escala CIELab con un colorímetro Minolta CR-400 (Konica Minolta, Japón) (datos no mostrados). Las medidas se realizaron antes y después de provocar el cambio de pH para todos los casos.

Análisis estadístico
Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza de dos factores (two-way ANOVA; dos factores: presencia o no de indicador ácido-base y pH, en cuatro y tres niveles respectivamente) y se empleó el test de Tukey para la comparación de medias, con α=0.05, empleando Statgraphics Plus (versión 5.1, Statgraphics, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Todas las películas preparadas con o sin colorantes, y a distintos pH resultaron homogéneas, translúcidas brillantes y delgadas (~ 50 μm). El espesor de las mismas no se vio modificado por la presencia y tipo de colorante empleado ($p>0.05$) ni por el pH de la solución filmogénica ($p>0.05$).
En la Figura 1 se muestra el aspecto visual de las mismas. Las películas de gelatina sin colorante (Control) resultaron incoloras y transparentes a todos los pHs evaluados. Por esta característica, la gelatina fue seleccionada como materia prima de manera que las películas pudieran adquirir la coloración propia del colorante adicionado, sin interferencias por parte del biopolímero. Con el agregado de los distintos colorantes a las formulaciones filmogénicas, se obtuvieron películas con coloración brillante y homogénea. El color de los materiales desarrollados se modificó dependiendo del pH (2, 6 u 11) de la solución filmogénica inicial de acuerdo con las características propias de cada colorante; naranja, amarillo y violeta para el NM; violeta, rojo y amarillo para RN; y amarillo y azul para las aditivadas con VBC respectivamente. Todas las películas presentaron una elevada transparencia, lo que resultaría particularmente interesante para aplicaciones en donde es necesario que el *packaging* permita visualizar al alimento envasado. La coloración alcanzada en las distintas películas también podría considerarse como un atributo adicional para algunas aplicaciones comerciales.

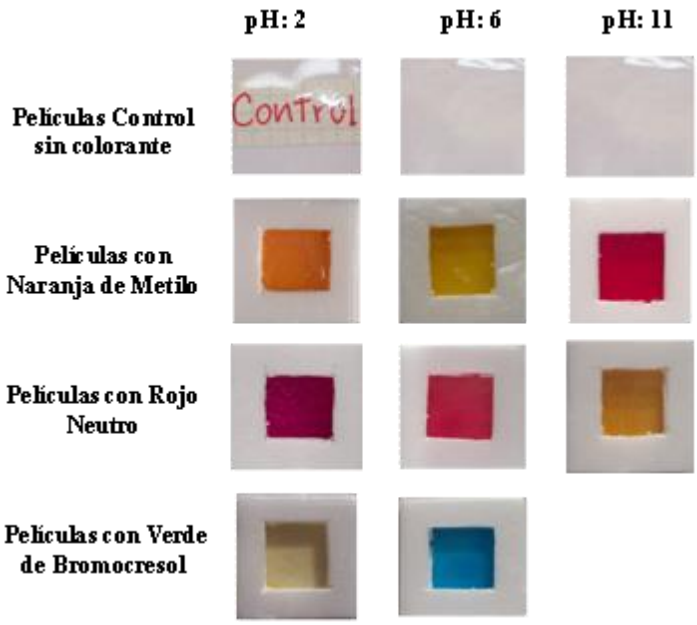


Figura 1: Películas de gelatina con o sin el agregado de colorantes a pH: 2, 6 y 11.

Efecto del agregado de indicadores ácido-base en las propiedades fisicoquímicas de los materiales.
El contenido de agua de las películas de gelatina con y sin agregado de colorantes a distintos pHs se muestra en Tabla 2. Las películas Control presentaron ~20% de agua. Estos valores son similares a los que describen Andreuccetti *et al* (2011) para películas elaboradas con gelatina porcina. El agregado de NM y RN disminuyó significativamente ($p<0.05$) el contenido de humedad de las películas resultantes, mientras que la adición de VBC no provocó cambios significativos ($p>0.05$) en este parámetro respecto del control. La variación de pH sólo modificó el contenido de agua de las películas sin colorante (Control) y el de las aditivadas con VBC. En ambos casos, las películas obtenidas a pH ácido presentaron los menores valores ($p<0.05$).

Tabla 2: Contenido de agua de las películas de gelatina con y sin agregado de colorantes a pH: 2, 6 y 11.

Contenido de agua (%)				
Película	**Control**	**NM**	**RN**	**VBC**
pH 2	$19,22 \pm 0,46^{a/x}$	$16,87 \pm 0,84^{b/x}$	$17,41 \pm 0,60^{b/x}$	$20,50 \pm 0,68^{a/x}$
pH 6	$22,11 \pm 0,62^{a/y}$	$16,33 \pm 0,47^{b/x}$	$17,46 \pm 1,12^{b/x}$	$23,25 \pm 1,16^{a/y}$
pH 11	$21,47 \pm 0,29^{a/y}$	$17,28 \pm 0,30^{b/x}$	$16,45 \pm 0,11^{c/x}$	

Los valores informados son promedio ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila (a, b, c) indican diferencias significativas ($p <0.05$) respecto de la presencia de colorante, de acuerdo al test de Tukey. Letras diferentes en la misma columna (x, y, z) indican diferencias significativas respecto del pH ($p <0.05$), de acuerdo al test de Tukey.

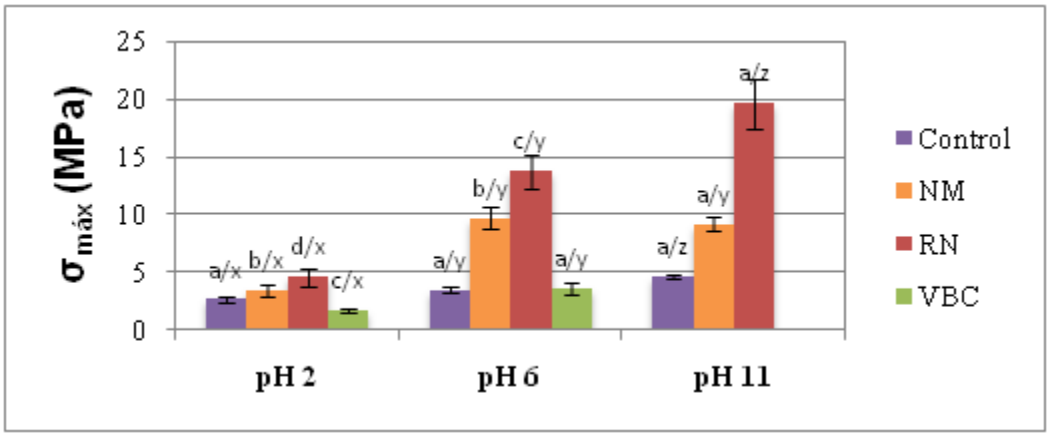
En la Tabla 3 se muestra la solubilidad en agua de los materiales desarrollados. Las películas Control resultaron moderadamente solubles en agua (37-49%). La incorporación de NM en la matriz de gelatina disminuyó su solubilidad en agua ($p<0.05$), siendo este efecto más notorio a pH 11 (disminución de ~60%) que a pHs 2 y 6 (disminución de ~40%). Respecto a las películas aditivadas con los otros indicadores, sólo las combinaciones VBC-pH=6 y RN-pH=11 presentaron menores valores de solubilidad en agua que sus respectivos Controles ($p<0.05$). Las películas elaboradas a pH ácido, tanto Controles como coloreadas, fueron más solubles que las obtenidas a pH neutro o alcalino ($p<0.05$), lo que sugeriría un diferente grado de entrecruzamiento dependiendo del pH de las dispersiones y de la presencia de estos indicadores.

Tabla 3: Solubilidad en agua de las películas de gelatina con y sin agregado de colorantes a pH: 2, 6 y 11.

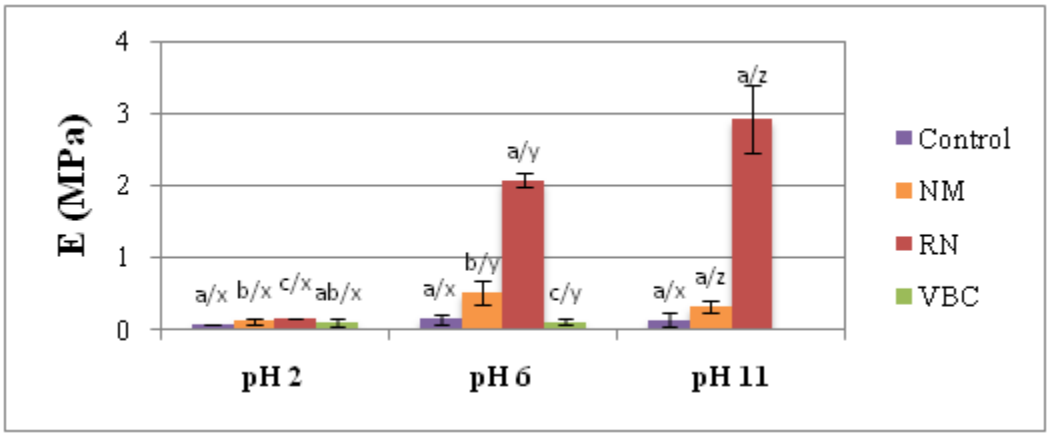
Solubilidad en agua (%)				
Película	**Control**	**NM**	**RN**	**VBN**
pH 2	$49{,}63 \pm 1{,}64^{a/x}$	$30{,}70 \pm 2{,}96^{b/x}$	$53{,}52 \pm 4{,}41^{a/x}$	$51{,}25 \pm 0{,}85^{a/x}$
pH 6	$37{,}61 \pm 2{,}71^{a/y}$	$23{,}23 \pm 1{,}41^{b/y}$	$38{,}11 \pm 1{,}85^{a/y}$	$21{,}48 \pm 0{,}48^{b/y}$
pH 11	$37{,}61 \pm 1{,}81^{a/y}$	$15{,}15 \pm 0{,}01^{b/z}$	$34{,}09 \pm 1{,}03^{b/y}$	

Los valores informados son promedio ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila (a, b, c) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto de la presencia de colorante, de acuerdo al test de Tukey. Letras diferentes en la misma columna (x, y, z) indican diferencias significativas respecto del pH ($p < 0.05$), de acuerdo al test de Tukey.

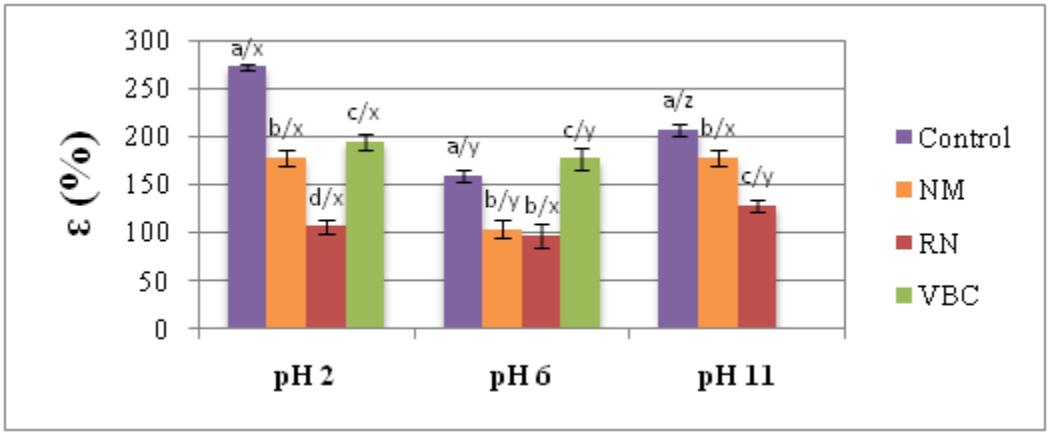
Independientemente de las observaciones en el contenido de agua y la solubilidad de las películas, no se observaron diferencias significativas en sus permeabilidades al vapor de agua ($\sim 7 \cdot 10^{-11}$ g H_2O s^{-1} m^{-1} Pa^{-1}) con la presencia y tipo de colorante ($p>0.05$) ni con el pH ($p>0.05$). Los valores de WVP encontrados son similares a los descriptos por Tongnuanchan *et al.* (2012) para películas elaboradas con gelatina de pescado ($\sim 4\ 10^{-11}$ g H_2O s^{-1} m^{-1} Pa^{-1}) y también para otras películas proteicas (Gennadios 2002, Bourtoom 2008).
En las Figura 2 se presentan las propiedades mecánicas (medidas en tracción) de las películas desarrolladas: tensión máxima, módulo elástico y elongación a rotura (Figura 2 paneles A, B y C respectivamente). Las películas Control mostraron moderadas propiedades mecánicas ($\sigma_{máx}\sim$ 2,6-4,6 MPa; $\varepsilon\sim$150-270%; E~3,5-12 MPa), similares a los valores informados en la bibliografía para películas de gelatina de pescado (Gómez-



A



B



C

Figura 2: Propiedades mecánicas (medidas en tracción) de las películas de gelatina con y sin agregado de colorantes a pH: 2, 6 y 11. **A)** Tensión máxima ($\sigma_{máx}$), **B)** Módulo de Young (E) y **C)** Elongación a rotura (ε). Los valores informados son promedio ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila (a, b, c, d) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto de la presencia de colorante, de acuerdo al test de Tukey. Letras diferentes en la misma columna (x, y, z) indican diferencias significativas respecto del pH ($p < 0.05$), de acuerdo al test de Tukey.

Guillén *et al.* 2012). Estas propiedades se vieron afectadas tanto por la presencia y tipo de colorante ($p<0.05$) como por el pH de la dispersión proteica inicial ($p<0.05$).El agregado de NM o RN a las formulaciones produjo películas que presentaron mayores valores de tensión y módulo elástico, y menores elongaciones a

rotura que las correspondientes películas Control ($p<0.05$). Estas mejoras resultaron más notorias a pHs neutro y alcalino que a pH ácido. Por otra parte, el agregado de VBC empeoró las propiedades de los materiales a pH ácido ($p<0.05$), mientras que no modificó significativamente las propiedades de las películas obtenidas a pH neutro ($p>0.05$). En todos los casos, las películas obtenidas a pH 2 fueron menos resistentes y más elongables que las de pH 6 y 11 ($p<0.05$). Estos resultados sugieren que NM y RN estarían favoreciendo el entrecruzamiento proteico, haciendo a las películas más resistentes, pero sin modificar su permeabilidad al vapor de agua.

Respuesta de las películas a cambios de pH

En la Figuras 3, 4 y 5 se muestran fotografías de los materiales proteicos aditivados con los distintos colorantes (naranja de metilo, rojo neutro y verde de bromocresol respectivamente), y su respuesta frente a diferentes medios –líquidos, gaseosos y semisólidos– a distintos pHs –ácido, neutro y alcalino–.

Las películas de gelatina con NM (Figura 3) modificaron su coloración al estar en contacto con líquidos ácidos y alcalinos. Por ejemplo, las películas con NM obtenidas a pH 6 resultaron inicialmente amarillas, mientras que al agregar HCl o NaOH se tornaron naranjas o violetas respectivamente. El mismo comportamiento se observó cuando se expusieron los materiales a atmósferas gaseosas ácidas o alcalinas. Cabe destacar que la atmósfera ácida producida por ácido acético no modificó la coloración de la película amarilla (a pH 6), tornó amarilla a la película violeta (a pH 11), pero no llegó al color naranja característico del NM en pH ácido. Esto se podría atribuir a que el pKa del ácido acético (pKa~4.8) es mayor que el pH de viraje del NM a su forma ácida (pH<4). Asimismo, cuando las películas se pusieron en contacto con geles de diferentes pHs, su color se modificó, excepto para las películas a pH neutro en contacto con un gel de pH: 2.5. Por otro lado, y como era de esperar, se observó que si no hay cambios de pH entre el medio y la película, éstas no modificaron su coloración.

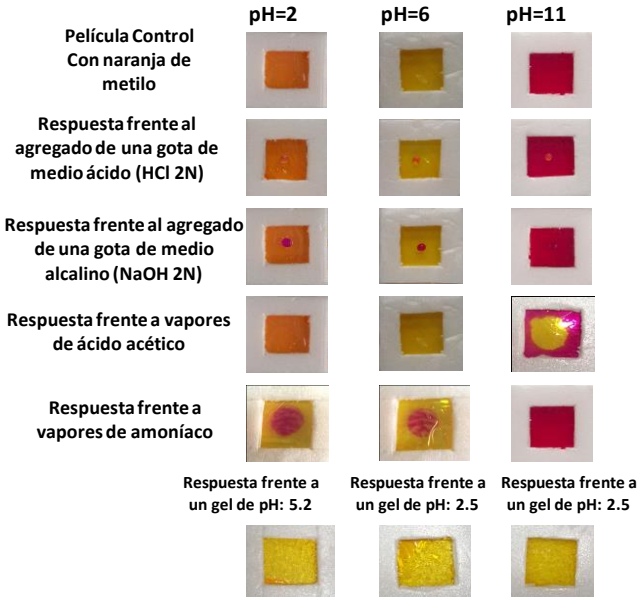


Figura 3: Películas de gelatina aditivadas con naranja de metilo (NM) y sus respuestas frente a medios líquidos, gaseosos y semisólidos a distintos pHs.

En las películas con el agregado de RN (Figura 4) todos los materiales proteicos modificaron su coloración al agregar una gota de ácido o de álcali, mostrando la respuesta al cambio de pH, al igual que cuando se las sometió a atmósferas gaseosas ácidas o alcalinas. Sin embargo, cuando se simuló el contacto de la película proteica con alimentos semisólidos el cambio de coloración resultó menos evidente. La cinética de viraje del indicador al estar en contacto con un gel a distinto pH resultó más lenta que al contactarlo directamente con líquidos o gases ácidos o alcalinos.

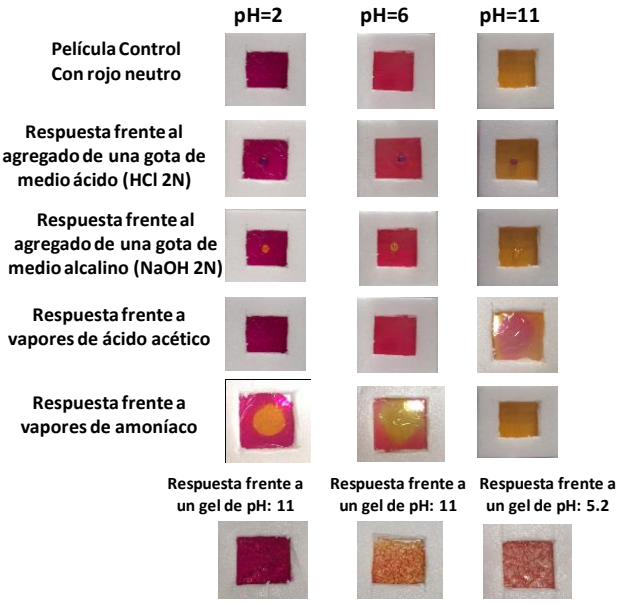


Figura 4: Películas de gelatina aditivadas con rojo neutro (RN) y sus respuestas frente a medios líquidos, gaseosos y semisólidos a distintos pHs.

Cuando el colorante adicionado fue VBC (Figura 5) se observó un comportamiento similar a las aditivadas con RN, para los distintos medios ensayados. Se observaron cambios de coloración al estar en contacto con medios líquidos y gaseosos, tanto ácidos como alcalinos. Estos cambios de coloración resultaron muy notorios ya que las películas cambiaron de amarillo a azul o viceversa, lo que facilitaría la detección por parte del consumidor. Aunque no fue tan pronunciado en los materiales semisólidos como puede observarse en la figura.
Los cambios de coloración descritos también fueron confirmados mediante medidas colorimétricas (datos no mostrados).

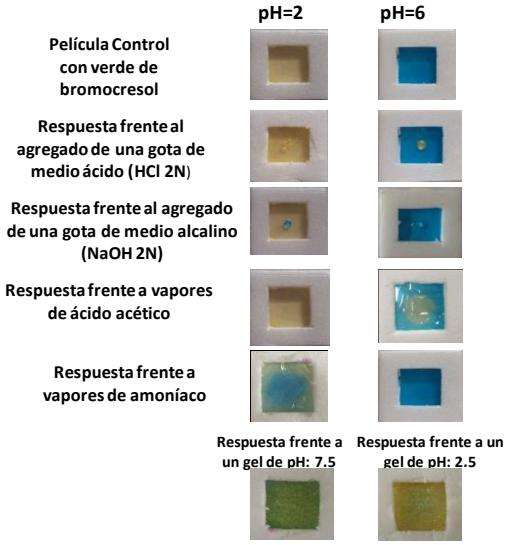


Figura 5: Películas de gelatina aditivadas con verde de bromocresol (VBC) y sus respuestas frente a medios líquidos, gaseosos y semisólidos a distintos pHs.

CONCLUSIONES

Se desarrollaron materiales proteicos en base a gelatina capaces de detectar cambios de pH por incorporación de indicadores ácido-base en su formulación. Todas las películas proteicas aditivadas respondieron, modificando su coloración al estar en contacto con medios líquidos, gaseosos y semisólidos a diferente pHs. Estos materiales podrían emplearse como envases o recubrimientos de alimentos y servirían para comunicar al consumidor, si el producto se encuentra apto para su consumo o no. El agregado de los distintos colorantes a las formulaciones de películas de gelatina, además de otorgarles a éstas la capacidad de detectar cambios

de pH modificando su coloración, modificó las propiedades fisicoquímicas de las películas. En particular el agregado de naranja de metilo pareciera favorecer el entrecruzamiento proteico aumentando la resistencia mecánica y disminuyendo la solubilidad en agua de las películas, sin impedir la respuesta de los materiales al cambio de pH.

BIBLIOGRAFÍA

Ahvenainen R. 2003. Novel food packaging techniques. CRC Press, Boca Raton. USA.
Andreuccetti C, Carvalho R, Galicia-García T, Martinez-Bustos F. 2011. Journal of Food Engineering, 103, 129-136.
ASTM, Annual book of ASTM standards. 2004. ASTM International: Philadelphia, PA, USA.
Bourtoom T. 2008. International Food Research Journal, 15: 237-248.
Brody AL, Bugusu B, Han JH, Koelsch C, McHugh TR. 2008. Journal of Food Science, 73: 107-116.
Dainelli D, Gotard N, Spyropoulos D, Zondervan-van den Beuken E, Tobback P. 2008. Trends in Food Science & Technology, 19: S103-S112.
Gennadios A. 2002. Protein based films and coatings. CRC Press, Boca Raton, USA.
Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero ME, Montero MP. 2011. Food Hydrocolloids, 25: 1813-1827.
Kerry J, Butler P. 2008. Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods. John Wiley & Sons, UK.
Kerry JP, O´Grady MN, Hogan SA. 2006. Meat Science. 74: 113-130.
Restuccia D, Spizzirri UG, Parisi OI, Cirillo G, Curcio M, Iemma F, Puoci F, Vinci G, Picci N. 2010. Food Control, 21: 1425-1435.
Tongnuanchan P, Benjakul S, Prodpran T. 2012. Food Chemistry, 134: 1571-1579.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la ANPCyT (PICT-2010-1837) y a la UNLP (11-X618) por el financiamiento otorgado para la realización del presente trabajo.

Caracterización reológica de queso Mozzarella a través de la viscosidad compleja de sus estados sólido y fundido

Olivares M.L., Rubiolo A.C., Zorrilla S.E.

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (UNL-CONICET), Santa Fe, Argentina.
olivares@santafe-conicet.gov.ar

Resumen: Las propiedades funcionales más importantes del queso Mozzarella están relacionadas con la reología de los estados sólido y fundido. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del envasado en atmósferas protectoras sobre las características reológicas de queso Mozzarella feteado. Se obtuvieron fetas que se envasaron al vacío (EV) y usando una mezcla de 50% de CO_2 y 50% de N_2 (EG).
Se realizaron barridos de temperatura de 20 a 60°C y se analizó la influencia de la temperatura sobre la viscosidad compleja a través de una ecuación del tipo Arrhenius. Se obtuvieron valores de energía de activación (*Ea*) en una región de comportamiento sólido (20 - 40°C) y en una región de comportamiento líquido (40 - 60°C). Se observaron comportamientos reológicos diferentes en ambos rangos de temperatura. Asimismo, se observó que la viscosidad compleja cambia más rápidamente a mayores tiempos de almacenamiento cuando se utilizó el método EG. Se podría inferir que la compresión inducida por el método EV modifica características microestructurales, tales como el arreglo de la matriz proteica, el tamaño o la forma de los glóbulos de grasa o la distribución del agua.

Palabras clave: queso Mozzarella, atmósferas protectoras, reología

Abstract: The most important functional properties of Mozzarella cheese are related to the rheology of the solid and melted states. Therefore, the aim of this work was to study the effect of protective atmospheres on rheological characteristics of sliced Mozzarella cheese. Slices were obtained and packaged under vacuum (EV) and under a mixture of equal parts of CO_2 and N_2 (EG). Temperature sweep tests were carried out from 20 to 60°C and the influence of temperature on complex viscosity was analysed by an Arrhenius-type equation. Activation energy values were obtained from a solid-like region (20 - 40°C) and a liquid-like region (40 - 60°C). Different rheological behaviours were observed in both temperature ranges. In addition, it was observed that complex viscosity changes faster at larger storage times and when the storage method EG was applied. It may be inferred that the compression induced by the storage method EV modifies cheese microstructural characteristics, such as, the arrangement of protein matrix, size and shape of fat globules or water distribution.

Keywords: Mozzarella cheese, protective atmospheres, rheology

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista reológico, el queso se puede clasificar como un sistema multifásico que exhibe un comportamiento viscoelástico que cambia gradualmente desde un estado principalmente sólido hacia un estado líquido a medida que se calienta. En el caso particular del queso Mozzarella, sus propiedades funcionales más importantes están relacionadas con la reología de los estados sólido y fundido. En este sentido, los ensayos reológicos pueden ser utilizados como herramientas para el control de calidad y para detectar cambios microestructurales provocados por la aplicación de métodos de conservación que pueden afectar las propiedades funcionales deseables en este tipo de queso.
El envasado en atmósferas protectoras (EAP) aumenta la vida comercial de los quesos debido a que se combina convenientemente la protección contra la oxidación y la deshidratación con la inhibición de microorganismos indeseables. En estas tecnologías se usan films con baja permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua y medios gaseosos modificados. El envasado del producto también puede ser al vacío aunque no es adecuado para productos frágiles tales como los quesos feteados (García Iglesias *et al.* 2006). Por otro lado, las atmósferas que contienen CO_2 y N_2 han sido efectivas para inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables.
A pesar de que las tecnologías EAP se utilizan cada vez más para el envasado de queso Mozzarella, se encuentran pocos trabajos científicos donde se evalúen las condiciones óptimas de envasado y los efectos sobre las características microestructurales del queso (Eliot *et al.* 1998). Más aún, no se han encontrado

trabajos que evalúen el efecto de la aplicación de EAP sobre la capacidad de fundido. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del EAP sobre las características reológicas de queso Mozzarella feteado en sus estados sólido y fundido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Se usaron 7 barras de queso Mozzarella recién elaboradas (28×10×10 cm^3), las cuales se almacenaron a 4°C durante 15 días. Luego, se obtuvieron fetas de 2 mm de espesor que se envasaron en bolsas de policloruro de vinilideno marca Cryovac con permeabilidad al oxígeno 10-18 cm^3 m^{-2} $día^{-1}$ bar^{-1} (23°C, 0% HR) y velocidad de transmisión de vapor de agua de 7.5 g $día^{-1}$ m^{-2} (38°C, 100% HR). Se evaluaron dos métodos de envasado: envasado al vacío (EV) y envasado con una mezcla de 50% de CO_2 y 50% de N_2 (EG). Los gases usados fueron mezclas industriales provistas por Praxair Argentina S.R.L. Para cada tratamiento, se obtuvieron 60 bolsas con 10 fetas cada una, las cuales se almacenaron a 4°C durante 8 semanas.

Ensayos reométricos

Muestras obtenidas a 8, 15, 29, 43 y 57 días de almacenamiento fueron utilizadas para los ensayos reométricos. Estos ensayos se realizaron usando un reómetro Haake RheoStress RS80 (Haake Instrument Inc., Paramus, NJ, U.S.A.) con geometría de platos paralelos (35 mm de diámetro y 2 mm de separación). Para evitar el resbalamiento de la muestra se colocó papel de lija en el plato superior. Se realizaron barridos de temperatura de 20 a 60°C (1.33 °C min^{-1}) a una amplitud de deformación de 0.01 y una frecuencia de 1 Hz. La región viscoelástica lineal se determinó realizando barridos de deformación de 0.001 a 0.1 a 20 y 60°C, para todos los tiempos de maduración analizados.

Los valores obtenidos en estado dinámico incluyen los dos componentes del módulo complejo (G^*): el módulo de almacenamiento (G'), el cual es una medida de la energía recuperada y almacenada por ciclo de deformación (componente elástica) y el módulo de pérdida (G''), el cual contiene la información referida a la energía disipada o pérdida por ciclo de deformación (componente viscosa) (Gunasekaran y Ak 2003). Estos parámetros están relacionados de la siguiente forma:

$$|G^*|^2 = (G')^2 + (G'')^2 \quad (1)$$

Se analizó el efecto de la temperatura en la viscosidad compleja ($|\eta^*| = |G^*|/\omega$, ω es la frecuencia de oscilación) mediante una ecuación del tipo Arrhenius:

$$|\eta^*| = A_{VISC} \exp(Ea/RT) \quad (2)$$

donde A_{VISC} es un factor pre-exponencial, Ea es la energía de activación (cal mol^{-1}), R es la constante de los gases (1.9872 cal mol^{-1} K^{-1}) y T es la temperatura (K) (Rao 1999, Tunick 2000, 2010).

Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics (Statgraphics Inc., Rockville, MD, U.S.A.). Cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$), se realizó una comparación múltiple de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A través de los barridos de temperatura, se analizó la influencia de ésta sobre las propiedades reológicas del queso Mozzarella. Los cambios de G' y G'' con la temperatura se muestran en la **Figura 1** donde se observa la transición desde el estado sólido hacia el estado fundido. Por debajo de los 40°C, el material se comporta como un sólido elástico, presentado valores de G' mayores a los de G''. A medida que la temperatura aumenta, el queso comienza a fundir y a experimentar cambios estructurales. Estos cambios incluyen la transición de la grasa desde el estado sólido al estado líquido y el aumento de la movilidad de la fase proteica (Muliawan y Hatzikiriakos 2007). En efecto, la temperatura a la cual se produce el cruce de los módulos ($G' = G''$) indica el comienzo del fundido del queso. Luego, los valores de G'' comienzan a superar a los de G' mostrando un comportamiento similar al de un fluido viscoso (Gunasekaran y Ak 2003). Estos resultados coinciden con los reportados en la literatura para este tipo de material (Gunasekaran y Ak 2003). Además, en

estos sistemas, el agua actúa como plastificante y modifica algunas propiedades de los polímeros alimenticios presentes (Gunasekaran y Ak 2003). Cuanto más hidratada está la estructura de las proteínas éstas pueden deslizarse más fácilmente unas sobre otras, favoreciendo la capacidad de fundido.

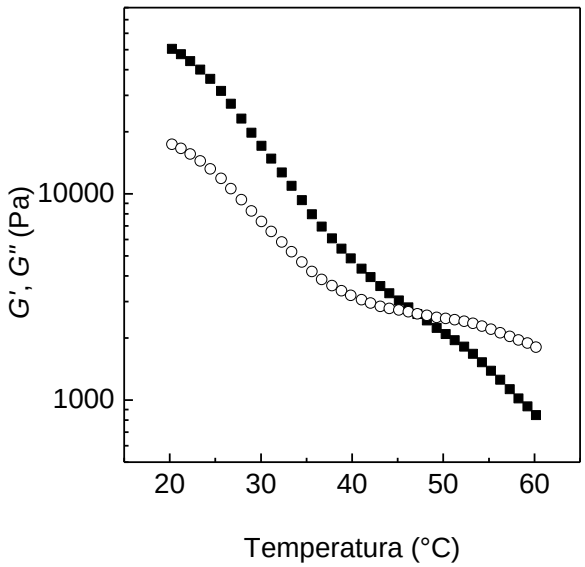


Figura 1: Barrido de temperatura característico de una muestra de queso Mozzarella almacenada al vacío durante 29 días. (■) *G'*, (○) *G''*.

Asimismo se obtuvo información microestructural a través de los barridos de temperatura analizando la energía de activación (*Ea*) estimada con la ecuación (2). Es relevante mencionar que para el caso de los quesos, *Ea* no tiene el significado típico de barrera energética que se debe superar para vencer la resistencia al flujo. En los quesos, *Ea* cuantifica cuán rápido se degrada la estructura a medida que éste se calienta (Tunick 2010). Por lo tanto, los valores de *Ea* pueden proveer mayor información referente al efecto del tiempo de almacenamiento y el tipo de envasado sobre los cambios que ocurren en la matriz de queso con el calentamiento.

Teniendo en cuenta que la grasa es el único sólido presente en el queso que verdaderamente funde alrededor de 40°C, se puede inferir que por encima de esta temperatura el material es estructuralmente diferente (Muliawan y Hatzikiriakos 2007). Por lo tanto, los datos de viscosidad compleja adquiridos se dividieron en dos rangos de temperatura y se obtuvieron valores de *Ea* de la región de comportamiento sólido (20 - 40°C) y de la región de comportamiento líquido (40 - 60°C). La **Figura 2** muestra claramente las diferencias de comportamiento reológico del queso en ambos rangos de temperatura.

Los valores de *Ea* para las diferentes condiciones estudiadas se listan en la **Tabla 1**. Se observó que los valores obtenidos en la región de comportamiento sólido son mayores a los obtenidos de la región de comportamiento líquido. Esto indica un cambio más rápido de la viscosidad compleja con la temperatura en el rango de 20 - 40°C (Steffe 1996). El ANOVA indicó que los factores principales tiempo de almacenamiento y método de envasado tuvieron efecto significativo en los valores de *Ea* obtenidos en ambos rangos de temperatura. En el rango de 20 - 40°C, *Ea* aumentó con el tiempo de almacenamiento, mientras que se obtuvieron valores mayores en las muestras EV. En el rango de 40 - 60°C, *Ea* aumentó con el tiempo de almacenamiento pero este comportamiento no fue claramente observado en las muestras EG.

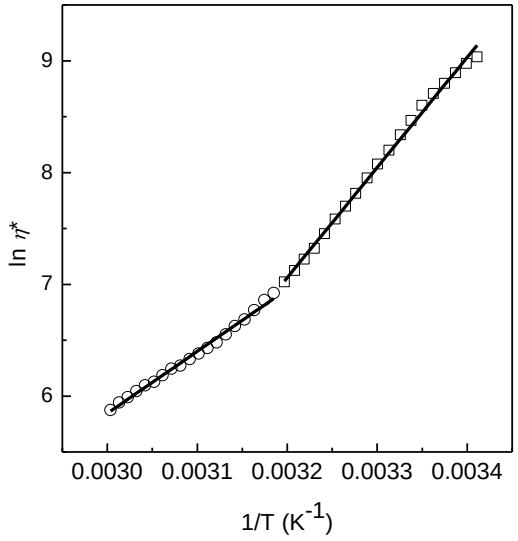


Figura 2: Valores de viscosidad compleja característicos en función de la inversa de la temperatura absoluta de una muestra de queso Mozzarella almacenada al vacío durante 8 días.
(□) intervalo de 20 - 40°C, (○) intervalo de 40 - 60°C.

Tabla 1: Valores promedio de energía de activación correspondientes a las muestras de queso Mozzarella estudiadas.*

Método de envasado	**Tiempo de almacenamiento (días)**	***Ea* (Kcal mol^{-1}) Rango: 20 - 40°C**	***Ea* (Kcal mol^{-1}) Rango: 40 - 60°C**
EV	8	18.9^{a}	11.6^{c}
	15	20.7^{bc}	10.4^{b}
	29	21.7^{cde}	9.9^{ab}
	43	21.9^{de}	13.5^{d}
	57	22.5^{e}	13.7^{d}
EG	8	18.6^{a}	11.6^{c}
	15	20.0^{b}	10.9^{bc}
	29	20.2^{b}	9.0^{a}
	43	20.9^{bcd}	10.0^{ab}
	57	21.9^{de}	11.5^{c}

* Los valores promedio con letras diferentes en una columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

A través del estudio de *Ea* se observó que la matriz de queso se degradó más rápidamente con el calentamiento a mayores tiempos de almacenamiento y cuando se usó el método EV. Sin embargo, la degradación de la matriz del queso fue menos perceptible en el rango de comportamiento líquido. Por lo tanto, el rango de temperatura seleccionado para la evaluación de *Ea* resulta crítico para detectar cambios microestructurales ocurridos en el queso. Se podría inferir que la compresión inducida por el método EV modifica características microestructurales, tales como el arreglo de la matriz proteica, el tamaño o la forma de los glóbulos de grasa o la distribución del agua (Olivares *et al.* 2012). Estos resultados también muestran que los valores de *Ea* obtenidos a partir de datos de viscosidad compleja son capaces de detectar cambios microestructurales que pueden afectar algunas propiedades funcionales del queso Mozzarella.

CONCLUSIONES

Se concluye que ambos métodos de envasado resultaron efectivos para mantener las propiedades reológicas adecuadas para el queso Mozzarella durante el período de almacenamiento estudiado, aunque se observó un comportamiento reológico diferente debido al método de envasado, el cual se podría asociar a diferencias en las características microestructurales del material.

Estos resultados muestran además la sensibilidad que presentan los ensayos reométricos para detectar cambios microestructurales capaces de influir en forma significativa sobre las propiedades funcionales del queso Mozzarella.

BIBLIOGRAFÍA

Eliot SC, Vuillemard JC, Emond JP. 1998. Stability of shredded Mozzarella cheese under modified atmospheres. Journal of Food Science, 63(6): 1075-1080.

García Iglesias E, Gago Cabezas L, Fernandez Nuevo JL. 2006. Informe de Vigilancia Tecnológica, Dirección General de Universidades e Investigación, Madrid. Disponible en: http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt3_tecnologias_de_envasado_en_atmosfera_protectora.pdf.

Gunasekaran S, Ak MM. 2003. Cheese rheology and texture. Boca Raton, CRC Press. pag 437.

Muliawan EB, Hatzikiriakos SG. 2007. Rheology of Mozzarella cheese. International Dairy Journal, 17: 1063-1072.

Olivares ML, Sihufe GA, Capra ML, Rubiolo AC, Zorrilla SE. (2012). Effect of protective atmospheres on physicochemical, microbiological and rheological characteristics of sliced Mozzarella cheese. LWT - Food Science and Technology, 47: 465-470.

Rao MA. 1999. Rheology of fluids and semisolid foods. Principles and applications. Gaithersburg, Aspen. pag 443.

Steffe JF. 1996. Rheological methods in food process engineering. (2nd ed.). East Lansing, Freeman Press. Pag 418.

Tunick MH. 2000. Symposium: dairy products rheology - Rheology of dairy foods that gel, strech, and fracture. Journal of Dairy Science, 83(8): 1892-1898.

Tunick MH. 2010. Activation energy measurements in rheological analysis of cheese. International Dairy Journal, 20: 680-685.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por la Universidad Nacional del Litoral, el CONICET y la ANPCyT. Los autores agradecen a Sancor Cooperativas Unidas Ltda. por el suministro de los quesos y a la empresa Sealed Air - Argentina por el suministro de los envases.

Biodisponibilidad de nisina y natamicina en películas de almidón de mandioca y su efecto sobre las propiedades físicas

Ollé Resa, C. P.[1, 2]; Jagus, R. J.[2]; Gerschenson, L. N.[3]

1- Becaria de ANPCyT.
2- Laboratorio de Microbiología Industrial: Tecnología de Alimentos, Departamento de Ingeniería Química, FI, UBA.
3- Departamento de Industrias, FCEN, UBA; Miembro de la Carrera del Investigador CONICET. Pabellón de Industrias, Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina.
carolinaolle@gmail.com

Resumen: Las películas comestibles pueden soportar antimicrobianos, contribuyendo a su concentración en superficie y/o a su liberación controlada, pudiendo ser útiles para la protección microbiológica de alimentos.
El objetivo del presente trabajo fue estudiar la biodisponibilidad de natamicina y nisina incluidas simultáneamente en películas comestibles constituidas en base a almidón de mandioca y plastificadas con glicerol, frente a *Saccharomyces cerevisiae* y *Listeria innocua* (cultivos simples o mixtos) mediante ensayos de difusión, y el efecto que producen estos antimicrobianos sobre el color y la solubilidad de las películas.

Palabras clave: natamicina, nisina, películas comestibles, almidón de mandioca.

Abstract: Edible films can support antimicrobial additives for the purpose of surface concentration and/or controlled release, being useful for the safety of food products.
The objective of the present research was the study of the biodisponibility of natamycin and nisin supported on edible films based on tapioca starch and plasticized with glycerol, in relation to the growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Listeria innocua* (simple or mixed cultures) using diffusion assays and the effect of these antimicrobials on the color and solubility of the films.

Keywords: natamycin, nisin, edible films, tapioca starch

INTRODUCCION

El principal objetivo del procesamiento de alimentos es proveer bienestar al ser humano por medio de alimentos seguros, nutricionalmente adecuados, cubriendo las expectativas de sabor, aroma, apariencia y accesibilidad. Para mejorar la estabilidad microbiana de la superficie de alimentos mínimamente procesados actualmente se encuentran en estudio una amplia variedad de antimicrobianos naturales (Gould 1997) en reemplazo de químicos sintéticos.
La natamicina, también conocida como pimaricina, es un macrólido polieno producido por *Streptomyces natalensis*. Se utiliza ampliamente en la industria alimentaria para prevenir la contaminación por hongos y levaduras de la superficie de quesos y otros alimentos no estériles (Reps et al. 2002; Gallo y Jagus 2006; El-Diasty et al. 2008). Ha sido aprobado como aditivo alimentario en más de 40 países y es considerado GRAS (generalmente reconocido como seguro) por la Food and Drug Admisnistration, FDA (Koontz et al. 2003). También está aprobado como conservante natural en la Unión Europea (CEE N° 235). La natamicina actúa uniéndose a los esteroles de la membrana micótica, principalmente al ergosterol, siendo de esta forma activo únicamente frente a hongos (te Welscher et al. 2008, 2010).
La nisina es un polipéptido producido por cepas de *Lactococcus lactis ssp. Lactis*. Exhibe actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias gram positivas asociadas a los alimentos y es particularmente efectiva contra esporas resistentes a las altas temperaturas (Delves-Broughton et al. 1996; Moll et al. 1997). Dentro de las bacteriocinas, la nisina está descripta como miembro de la Clase IA, el grupo que contiene a los lantibióticos (Klaenhammer 1993). Los lantibióticos de tipo A, como la nisina, son moléculas flexibles, elongadas y anfipáticas que actúan básicamente mediante la formación de poros en la membrana citoplasmática de las bacterias (Brotz y Sahl 2000). Se ha permitido su utilización en más de 50 países como preservante en distintos tipos de alimentos. Fue reconocido como preservante biológico seguro y legal en 1969 por el Comité Experto de Aditivos de Alimentos de FAO / WHO (Thomas et al. 2000). En 1988 fue aprobada como aditivo de alimentos por la FDA, y aceptada como un compuesto GRAS.

Las películas comestibles pueden soportar antimicrobianos, contribuyendo a su concentración en superficie y/o a su liberación controlada, pudiendo ser útiles para la protección microbiológica de los alimentos.
El objetivo del presente trabajo fue estudiar la biodisponibilidad de natamicina y nisina incluidas simultáneamente o por separado en películas comestibles constituidas en base a almidón de mandioca y plastificadas con glicerol, frente a *Saccharomyces cerevisiae* y *Listeria innocua* (cultivos simples o mixtos) y el efecto que producen estos antimicrobianos sobre el color y la solubilidad de las películas.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Se utilizó almidón de mandioca (Industrias del Maíz SA, Argentina) y glicerol (Mallickrodt, Argentina). Los antimicrobianos natamicina comercial (Delvocid®) conteniendo 50% p/p de NaCl y 50% p/p de natamicina y nisina comercial (Nisin®) conteniendo 97.5% p/p de NaCl y 2.5% p/p de Nisina, fueron donados por DSM (The Netherlands), filial Argentina.

Preparación del pelicula

Se prepararon mezclas de almidón, glicerol y agua (1.8:1:32.5, en peso) (C) o de almidón, glicerol, agua y natamicina (NA) o de almidón glicerol, agua, natamicina y nisina (NANI). En las dos últimas formulaciones, se reemplazaron 10 ml de agua por una suspensión de natamicina en el primer caso y de natamicina y nisina en el segundo caso, de una concentración tal que las películas contenían 9,25mg natamicina/dm^2 (NA) y 9,25mg de natamicina/dm^2 y 2,31mg de nisina/dm^2 (NANI).
La gelatinización del almidón se realizó a velocidad constante de 1,5°C/min, aproximadamente, hasta alcanzar una temperatura final de 82°C. Se aplicó vacío para eliminar el aire ocluido en el gel. La suspensión se dispensó en alícuotas de 12 g en placas de 7cm de diámetro. El secado de las películas se realizó a 37°C durante 24 horas en una cámara con convección. Una vez constituidas, las películas se separaron de las placas y se equilibraron a 28°C sobre solución saturada de NaBr (actividad de agua, $a_w \cong 0.575$) durante aproximadamente 7 días.

Solubilidad en agua

La solubilidad se define como el porcentaje de materia seca de película solubilizada después de 24 horas de inmersión en agua destilada (Gontard et al. 1992). El porcentaje inicial de la materia seca se determinó mediante el secado de discos de 2 cm de diámetro a 100ºC durante 24 horas y al vacío. Se cortaron discos adicionales, se pesaron y sumergieron en 50 ml de agua destilada, con agitación, durante 24 horas a 25 °C. Las películas no solubilizadas fueron sacadas y secadas en las condiciones previamente descriptas para determinar la materia seca remanente. La solubilidad se reporta como la diferencia entre la materia seca inicial y final con respecto a la materia seca inicial. La determinación se realizó por duplicado.

Evaluación del Color

Las mediciones de color en cada película evaluada se realizaron con un colorímetro Minolta (Minolta CM-508d, Tokio, Japón) utilizando una abertura de 1,5 cm de diámetro. Discos de películas de diámetro adecuado se apoyaron sobre un fondo blanco estándar (Trezza y Krochta 2000). El área expuesta era lo suficientemente grande con respecto a la zona iluminada como para evitar cualquier efecto de captura de luz. Se midieron los parámetros CIELab: L*, a* b*, y el índice de amarillo (YI) de acuerdo con el método de ensayo estándar (ASTM D1925, 1995), en al menos cuatro posiciones seleccionadas al azar para cada muestra. Los parámetros de color oscilan de L* = 0 (negro) a L* = 100 (blanco),-a* (verde) a +a* (rojo), y –b* (azul) a +b* (amarillo). Los valores estándar considerados fueron los del fondo blanco. Los cálculos se hicieron para el iluminante D-65 y con un observador a 2°.
Se evaluó la diferencia total de color (ΔE) (Hill et al. 1997) en las muestras tratadas con respecto al control (C) utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

Siendo:
$\Delta L^* = L^* - L_0^*$
$\Delta a^* = a^* - a_0^*$
$\Delta b^* = b^* - b_0^*$
donde L_0^*, a_0^* y b_0^* corresponden a los valores evaluados en el control C (película sin antimicrobiano) y L*, a* y b* corresponden a los valores de la muestra analizada.

Cepas y condiciones de crecimiento

Saccharomyces cerevisiae (CBS 1171, cepa de colección SC) se cultivó en 150 ml de caldo Sabouraud enriquecido con 6 g/l de extracto de levadura (Biokart, Francia) en continua agitación a temperatura controlada de 28°C hasta que se alcanzó la fase estacionaria temprana. *Listeria innocua* (CIP 80.11) se cultivó en 150 ml de caldo triptona soja (TSBYE, Diagnóstico Biokar, Francia), en continua agitación a temperatura controlada de 28°C durante la noche. Posteriormente, 2 ml de este cultivo fueron inoculados en caldo TSBYE fresco y agitado durante aproximadamente 1h hasta alcanzar la concentración de células buscada.

Para la preparación del cultivo mixto, cada uno de los microorganismos fue cultivado en su respectivo caldo hasta lograr la densidad poblacional deseada. Posteriormente, alícuotas de 30 ml de los cultivos fueron centrifugadas a 10.000 rpm y el pellet de células fue resuspendido en el mismo volumen de caldo TSYE.

Método de difusión en agar

El ensayo de difusión en agar se utilizó para determinar la biodisponibilidad de los antimicrobianos contenidos en las películas sobre *S.cerevisiae* y *L.innocua.* Brevemente, 100µl del inóculo que contenía $1x10^6$ UFC/ml de cada microorganismo, preparado de acuerdo a lo descripto en el ítem anterior, se extendieron sobre la superficie de placas de Petri conteniendo agar YGC, TSYE (Diagnóstico Biokar, Francia) y $TSYE_C$ (TSYE conteniendo cicloheximida, Sigma-Aldrich). Se colocaron discos de película (7 mm de diámetro) C, NA y NANI, sobre las placas previamente inoculadas.

Las placas se pre-incubaron a 4 °C durante 48 horas y posteriormente se incubaron a 28°C durante 72 horas (Hanušová et al. 2010). La actividad inhibitoria se cuantificó midiendo el diámetro total (disco más zona de inhibición).

Análisis estadístico de los datos

Los datos fueron analizados a través de un análisis de varianza de dos factores con α: 0,05 y se aplicó como prueba post-hoc el test de Tukey. Los resultados se presentan en función de su media y desviación estándar (Sokal y Rohlf 2000). Se utilizó el software GraphPad Prism ®, versión 5.01 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) para el tratamiento y análisis de datos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos mostraron que el agregado de natamicina a la película no modificó en forma marcada la solubilidad de la misma. Por el contrario, la presencia de nisina, aumentó significativamente (α: 0,05) este valor (Figura 1).

Basch et al. (2012) evaluaron películas elaboradas a partir de almidón de mandioca adicionadas con hidroxipropilmetilcelulosa, conteniendo sorbato de potasio y nisina. Estos investigadores observaron que la presencia de estos antimicrobianos aumentaba la solubilidad de la matriz y sugirieron que este efecto puede ser atribuido a la disrupción de la matriz polisacárida provocada por los antimicrobianos. En este sentido Flores et al. (2010) informaron que el agregado de estos antimicrobianos en las películas causa un incremento de la región amorfa, aumentando la interacción con el agua, lo cual podría incrementar la solubilidad y reducir la integridad de las películas en contacto con el solvente.

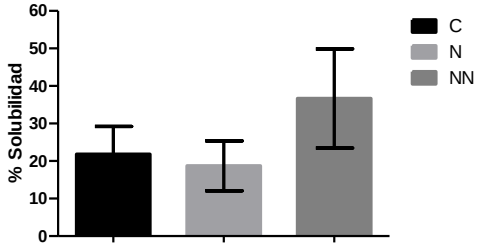


Figura 1: Solubilidad de las películas con y sin antimicrobianos. C: Control, NA: natamicina y NANI: natamicina+nisina.

La Figura 2 muestra los parámetros de color para las películas estudiadas. Se pudo observar que las tres películas presentaron valores de a* negativo y valores de b* positivos, lo que indica un color verde-amarillo de las mismas. Las diferencias en los parámetros evaluados fueron muy pequeñas entre la película

conteniendo natamicina y la película control, mostrando la primera, mayores valores de L*, b* y YI y menor valor de a*. Sin embargo, la presencia de nisina afectó los parámetros de color, disminuyendo la luminosidad e incrementándose el color amarillo respecto a la película con natamicina (aumento de b* y del índice de amarillo, YI). Estas películas fueron las que mostraron una mayor diferencia de color (ΔE) en relación a las películas control. Flores et al. (2010) reportaron que la adición de nisina a películas fabricadas en base a almidón de mandioca, producía un incremento del valor de b* de 4 a 12 unidades y una disminución del valor de L* desde 86 a 79.

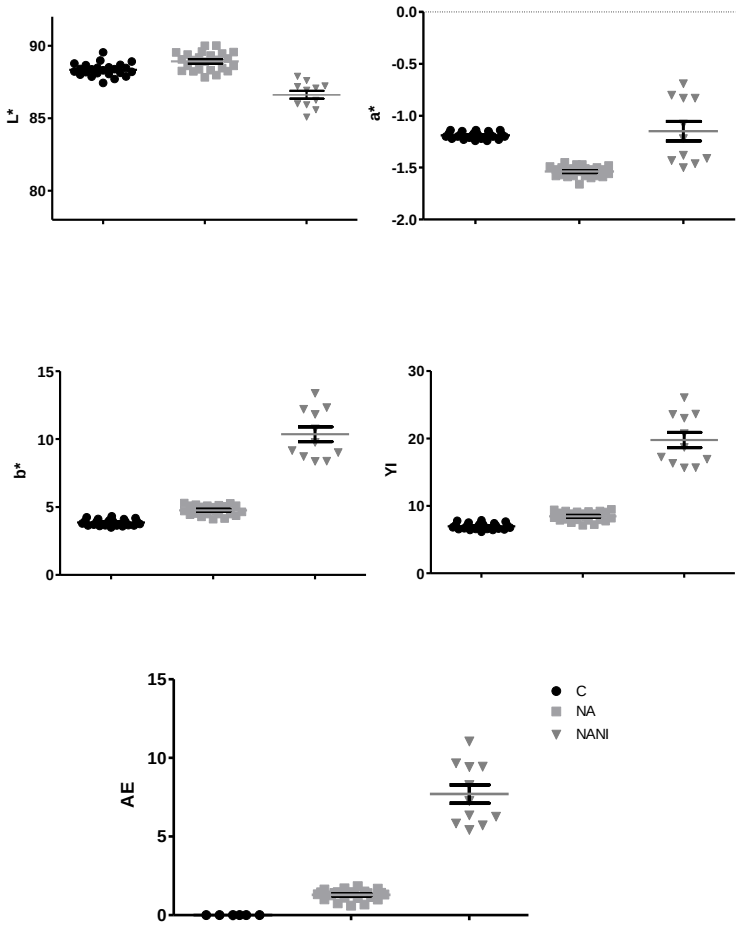


Figura 2: Parámetros de color de las películas con y sin antimicrobianos.C: Control, NA: natamicina y NANI: natamicina+nisina.

A través del ensayo de difusión en agar se pudo cuantificar la actividad antimicrobiana de las películas frente a poblaciones microbianas individuales y mixtas. La película C no mostró actividad inhibitoria hacia ninguno de los dos microorganismos evaluados. Por el contrario, las películas NA y NANI presentaron distinto grado de actividad antimicrobiana. Los antimicrobianos contenidos en las películas se liberaron a distinta velocidad, difundiendo a través del agar, y generando la formación de halos de inhibición de dimensiones significativas (Tabla 1).

La natamicina contenida en las películas y liberada hacia el agar (película NA) fue efectiva para inhibir el desarrollo de *S. cereviseae*, independientemente de la presencia de *L. innocua*, ya que el halo en el cultivo simple no presentó diferencias significativas con el observado en el cultivo mixto. Es de destacar que en el medio TSYE para el cultivo mixto, por debajo del halo de inhibición de la levadura se observó el crecimiento de bacterias (Figura 3a), ya que estas no fueron inhibidas por la natamicina liberada al medio.

Sin embargo, *L. innocua* tampoco pudo crecer en el medio YGC debido a que su composición restringió el crecimiento. Por otra parte, en los medios TSYE y $TSYE_C$, se observó un crecimiento sin restricciones de *L. innocua*. Este comportamiento fue análogo al observado en cultivo mixto.

Tabla 1: Ensayo de difusión. Diámetro de los halos de inhibición (cm) en cultivos simples y mixtos generados a partir de películas conteniendo natamicina (NA) o natamicina y nisina (NANI).

	Película NA sobre distintos medios			Película NANI sobre distintos medios		
Microorganismos en el cultivo	YGC	TSYE	$TSYE_C$	YGC	TSYE	$TSYE_C$
L. innocua	S/C	S/H	S/H	S/C	1,85 ± 0,07	1,85 ± 0,07
S. cereviseae	3,15 ± 0,07	2,95 ± 0,07	S/C	2,85 ± 0,07	2,95 ± 0,07	S/C
Mixto (*S. cereviseae* y *L. innocua*)	3,25 ± 0,07	3,15 ± 0,07	S/H	3 ± 0,07	Doble halo: 3,05 ± 0,07 y 1,85 ± 0,07	2,25 ± 0,40

S/C: sin crecimiento; S/H: sin halo.

Por otra parte, al evaluar la actividad de la película NANI se observaron halos de inhibición de 3 cm de diámetro, aproximadamente, cuando se enfrentaron a un césped de *S. cereviseae* en medio YGC y TSYE, siendo estos diámetros análogos a los observados en película NA.
La nisina contenida en las películas NANI fue efectiva para la inhibición de *L. innocua* mostrando un halo de 1,85 cm en los medios TSYE y $TSYE_C$. En presencia de un cultivo mixto, el halo observado fue función de los medios de cultivo en los que se realizó el césped. En medio YGC el halo correspondió a *S. cereviseae* y mostró valores semejantes a los observados con la película NA. En el medio $TSYE_C$ (medio restrictivo para levadura) se observó únicamente el halo de inhibición correspondiente a la actividad de la nisina liberada desde la película sobre *L. innocua.*
Cuando la película NANI se enfrentó a un cultivo mixto en medio TSYE (sin restricciones para el crecimiento de ambos microorganismos), se observan dos halos (Figura 3b). El más pequeño correspondió a la inhibición del desarrollo de *L. innocua* por la presencia de nisina, y su diámetro fue similar al observado cuando se evaluó el desarrollo de esta bacteria en forma individual. A su vez, el segundo halo correspondió al producido por la inhibición del crecimiento de *S. cereviseae* debida a la presencia de natamicina. También en este caso, el diámetro del halo fue comparable al observado en el cultivo individual.

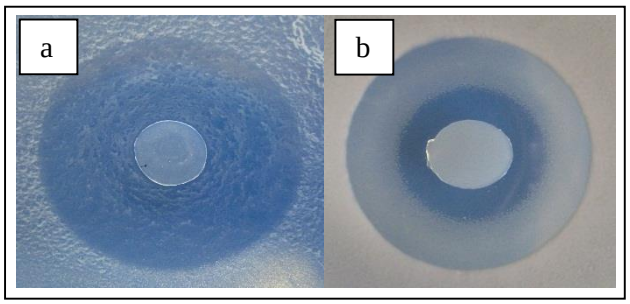


Figura 3: Ensayo de difusión: halos de inhibición observados a partir de un cultivo mixto (*S. cereviseae* + *L. innocua*) desarrollado en medio TSYE. a: película NA; b: película NANI.

Por todo lo antedicho, se puede concluir que la presencia de nisina en la película no afectó la biodisponibilidad de la natamicina.
Pintado et al. (2010) estudiaron películas de aislado proteico de suero con natamicina y nisina, solos o combinados y en presencia de ácido málico. Dichos autores observaron la formación de halos de tamaño semejante a los obtenidos en el presente trabajo e informaron que no existían diferencias entre las zonas de inhibición obtenidas con nisina sola o en combinación con natamicina contra las bacterias testeadas, y tampoco entre las zonas de inhibición obtenidas con natamicina sola o en combinación con nisina contra las levaduras testeadas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indicaron que la presencia de nisina en las películas combinadas (NANI) afectó el color y la solubilidad de las mismas. La presencia conjunta de natamicina y nisina en las películas

comestibles no afectó la biodisponibilidad de la natamicina en el control de crecimiento de la levadura y permitió contar con una matriz con un rango ampliado de actividad antimicrobiana, que pudo inhibir también el crecimiento de *L. innocua*, tanto en el caso de cultivo simple como mixto.

BIBLIOGRAFIA

Basch CY, Jagus RJ, Flores SK, 2012. Physical and antimicrobial properties of tapioca Starch-HPMC edible films incorporated with nisin and/or potassium sorbate. Food and Bioprocess Technology on line ve.

Brotz H, Sahl HG. 2000. New insights into the mechanism of action of lantibiotics — diverse biological effects by binding to the same molecular target. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 46:1–6.

Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholtz J. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. Antonie van Leeuwenhoek 69:193–202.

El-Diasty E, El-Kaseh R, Salem R. 2008. The effect of natamycin on keeping quality and organoleptic characters of yoghurt. Arab Journal of Biotechnology 12:41–48.

Flores SK, Famá L, Rojas AM, Goyanes SN, Gerschenson LN. 2007. Physical properties of tapioca-starch edible films. Influence of filmmaking and potassium sorbate. Food Research International 40:257–265.

Flore SK, Gerschenson LN, Jagus RJ, Sanjurjo KJ. 2010. Strategies for extending shelf life of foods using antimicrobial edible films. New York: Nova Science Publishers Inc.: In B. Siegler.

Gallo LI, Jagus RJ. 2006. Modelling Saccharomyces cerevisiae Inactivation by Natamycin in Liquid Cheese Whey. Brazilian Journal of food technology 9:311–316.

Gontard N, Guilbert S, Cuq J. 1992. Edible Wheat Gluten Films: Influence Variables on Film Properties using Methodology of the Main Process Response Surface. Journal of Food Science 57:190–195.

Gould G. 1997. Methods of preservation and extension of shelf life. International Journal of Food Microbiology 33:51–64.

Hanušová K, Šťastná M, Votavová L, Klaudisová K, Dobiáš J, Voldřich M, Marek M. 2010. Polymer Films Releasing Nisin And/or Natamycin from Polyvinyldichloride Lacquer Coating: Nisin and Natamycin Migration, Efficiency in Cheese Packaging. Journal of Food Engineering 99: 491–496.

Hill B, Roger T, Vorhagen FW. 1997. Comparative analysis of the quantization of color spaces on the basis of the CIELAB color-difference formula. ACM Transactions on Graphics 16:109–154.

Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews 12:39–85.

Koontz JL, Marcy JE, Barbeau WE, Duncan SE. 2003. Stability of natamycin and its cyclodextrin inclusion complexes in aqueous solution. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51:7111–7114.

Moll GN, Clark J, Chan WC, Bycroft BW, Roberts GCK, Konings WN, Driessen AJM. 1997. Role of transmembrane pH gradient and membrane binding in nisin pore formation. Journal of Bacteriology 179:135–140.

Pintado CMBS, Ferreira MASS, Sousa I. 2010. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. Food Control 21:240–246.

Reps A, Jedrychowski L, Tomasik J, Wisniewska K. 2002. Natamycin in ripening cheeses. Pakistan Journal of Nutrition 1:243–247.

Sokal R, Rohlf J. 2000. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. San Francisco, California: W. H. Freeman and Company.

Thomas LV, Clarkson MR, Delves-Broughton J. 2000. Nisin. Boca Raton: Natural Food Antimicrobial Systems.

Trezza T, Krochta JM. 2000. Color Stability of Edible Coatings During Prolonged Storage. Journal of Food Science 65:1166–1169.

te Welscher YM, Ten Napel HH, Balagué MM, Souza CM, Riezman H, De Kruijff B, Breukink E. 2008. Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. The Journal of Biological Chemistry 283:6393–6401.

te Welscher YM, Jones L, van Leeuwen MR, Dijksterhuis J, De Kruijff B, Eitzen G, Breukink E. 2010. Natamycin inhibits vacuole fusion at the priming phase via a specific interaction with ergosterol. edited by L Jones et al. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54:2618–2625.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico de: Universidad de Buenos Aires, Agencia Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y CONICET.

Evaluación de la capacidad de barrera antioxidante de películas comestibles de pectina a través de espectroscopia de fluorescencia. Cuantificación de tocoferoles.

Pérez C.D.[1, 3], De'Nobili M.D.[2, 3], Rizzo S.A.[1], Rossetti L.[1], Descalzo A.M.[1], Rojas A.M.[2, 3]

1: Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA), INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina
2: Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Ciudad Universitaria, CABA, Argentina
3: CONICET
cperez@cnia.inta.gov.ar

Resumen: Una película comestible (PC) de pectina de alto metoxilo (HMP) portadora de ácido L-(+)-ascórbico (AA), plastificada con glicerol, fue evaluada frente a un sustrato vulnerable a la oxidación como el aceite de nuez, por almacenamiento durante 50 días a 25°C y a 57% de humedad relativa (HR) constantes, en ausencia de luz. En estas condiciones de almacenamiento, el tiempo de vida medio ($t_{1/2}$) del AA en esta película fue de 83 días, según resultados previos. A partir de los espectros de fluorescencia (pico a 308 nm) se determinó que, durante los 50 días de almacenamiento, las muestras de aceite de nuez cubiertas con PC portadora de AA mantuvieron los niveles de tocoferoles significativamente ($p < 0.001$) por encima tanto de las muestras cubiertas con PCs elaboradas sin AA como de las muestras control almacenadas sin cubierta de ningún tipo. Además, se determinó el contenido de tocoferoles por HPLC, en las muestras de aceite recolectadas durante el almacenamiento del aceite de nuez en las condiciones arriba mencionadas, encontrándose una correlación significativa (coeficiente de correlación de *Pearson* r = 0,95; $p < 0.05$) entre la intensidad de fluorescencia detectada a 308 nm y el contenido de tocoferoles determinado por HPLC.

Palabras clave: películas comestibles, pectina, ácido L-(+)-ascórbico, tocoferoles, espectroscopía de fluorescencia.

Abstract: A high methoxyl pectin (HMP) edible film carrying L-(+)-ascorbic acid (AA) and plasticized with glycerol was evaluated against a vulnerable substrate of oxidative stress like walnut oil, by storage during 50 days in the dark at constant relative humidity (RH, 57%) and temperature (25 ºC). At these storage conditions, 83 days-half-life time ($t_{1/2}$) was previously determined for the AA compartmentalized in this HMP film formulation. From the fluorescence spectra (peak at 308 nm), it was determined that during the 50 days-storage, those walnut oil samples coated with the edible film carrying AA, showed their tocopherol levels significantly ($p<0.001$) above those values that were determined in walnut oil samples either coated with edible films made without AA or uncoated (control) samples. The tocopherol content was also determined by HPLC in walnut oil samples collected at different times during storage in the same conditions above mentioned. These values of tocopherol content correlated significantly (*Pearson* correlation coefficient $r = 0.95$; $p < 0.05$) with the fluorescence intensity observed at 308 nm in the fluorescence spectra.

Keywords: pectin edible films, L-(+)-ascorbic acid, tocopherols, fluorescence spectroscopy.

INTRODUCCION

Las películas comestibles definidas como finas láminas elaboradas con polímeros capaces de proveer fuerza mecánica a dicha estructura (Han y Gennadios, 2005) han sido aplicadas principalmente como recubrimientos en frutas y vegetales mínimamente procesados, carnes y derivados, pescados y derivados y quesos. En particular resulta de gran interés el desarrollo de PCs portadoras de antioxidantes naturales debido al efecto protectivo que ejercen principalmente contra la acción del oxígeno (Atarés *et al*., 2011).

Las nueces están recibiendo gran interés como alimento saludable debido a que se ha informado que su consumo regular disminuye el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Los beneficios saludables son atribuidos a su composición química ya que son fuente de ácidos grasos esenciales y tocoferoles. El principal ácido graso es el linoleico n-6 seguido por el oleico n-9 y linolénico n-3. Se ha sugerido que su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) reduce el riesgo de enfermedades del corazón por disminución del colesterol total y de la fracción asociada a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y aumento del colesterol asociado a la fracción de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Se ha informado que los alimentos de origen vegetal como las frutas, verduras y semillas son una fuente natural de antioxidantes. Los

antioxidantes poseen un rol importante en la prevención de enfermedades y mantenimiento de la salud. Es entonces útil también preservar los antioxidantes naturales propios de un producto, en su propia fuente. El efecto antioxidante demostrado por estos productos proviene de los compuestos fenólicos y de otros fitoquímicos, los que protegen del peligroso efecto de la excesiva producción de radicales libres (Pereira *et al*., 2008).

La principal fuente de vitamina E en la dieta son los aceites vegetales, nueces, cereales, vegetales verdes y frutas. El isómero γ-tocoferol es el mayor componente de la vitamina E en la dieta occidental y el segundo tocoferol más común en el suero humano (10 – 20%). Se ha reportado que dicho isómero es el principal componente en las nueces (Amaral *et al*., 2005), con lo cual posee actividad antioxidante, principalmente en la prevención de los procesos de oxidación de los lípidos (Pereira *et al*., 2008) sin embargo, su alto contenido de PUFA limita la vida útil debido a que son susceptibles a la oxidación. La oxidación de los lípidos es el parámetro de calidad más importante dado que reduce el valor económico de las nueces durante el almacenamiento. El resultado de la oxidación hace que el producto sea inaceptable por el consumidor debido al gusto rancio indeseable. La concentración de oxígeno es uno de los factores más importantes que afectan la oxidación, la cual se puede disminuir a través del uso de material de empaque con baja permeabilidad al oxígeno o por almacenamiento de las nueces en bajo nivel de oxígeno (Bakkalbas *et al*., 2012).

La espectroscopia de fluorescencia es una de las técnicas más prometedoras y de gran interés para el análisis de alimentos debido a su selectividad respecto a otras técnicas espectroscópicas, la alta sensibilidad para un amplio rango de potenciales analitos y, en general, el beneficio de evitar el uso de reactivos y tiempo en el pre-tratamiento de la muestra (Sikorska *et al*., 2005).

El aceite de nuez es un ingrediente funcional muy valorado debido a su alto contenido de PUFA. Los tocoferoles son los antioxidantes naturales del aceite de nuez. La vida útil de los tocoferoles condicionaría la aparición de los signos tempranos del deterioro oxidativo del aceite. El aceite de nuez obtenido del primer prensado en frío fue utilizado en el presente trabajo como sustrato vulnerable al estrés oxidativo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el desempeño como interfase antioxidante de una PC portadora de AA, desarrollada con HMP y plastificada con glicerol, utilizando aceite de nuez. Se recurrió a la espectroscopia de fluorescencia sincrónica como técnica de seguimiento de los cambios oxidativos tempranos acontecidos en el aceite. El componente del aceite que se vió modificado en los espectros de fluorescencia, fue luego confirmado a través de su detección y cuantificación por una técnica de HPLC.

MATERIALES Y METODOS.

Se utilizó aceite de nuez (IL Noce®, Parque Industrial de Escobar, Pcia. de Buenos Aires, Argentina) obtenido por prensado en frío de la nuez del nogal (*Junglans regia* L.), cuyos frutos maduros fueron cosechados durante el período 2009-2010 en la provincia de Catamarca, Argentina.

Las muestras de PC de HMP portadoras de AA y plastificadas con glicerol fueron elaboradas por el método de casteo según Pérez *et al*. (2009). De la misma manera se elaboraron muestras de esta PC, pero sin agregar AA a la formulación. De esta manera se conformaron tres grupos de ensayo simultáneo: 1) "control"; 2) "PC con AA"; 3) "PC sin AA". Cada placa contenedora de vidrio de 25 mm de diámetro fue llenada totalmente con una muestra de aceite y, luego, totalmente cubierta con uno u otro tipo de PC, excepto el grupo "control" (sin cubrir). Todas las placas fueron almacenadas al resguardo de la luz, y a 57% HR y 25 ºC constantes durante 50 días. Los experimentos se realizaron por duplicado. Se tomaron muestras en tiempos pre-establecidos: 0, 8, 15 y 50 días. Para cada muestra se registraron los espectros de fluorescencia sincrónicos utilizando un LS 55 fluorescence Spectrometer 230V (Perkin Elmer, Massachusetts, Estados Unidos) montado con el accesorio front-surface de ángulo variable y cubeta de cuarzo de 10 mm.

Se realizaron las extracciones de vitaminas liposolubles y la saponificación según Buttriss y Diplock (1984) y el análisis utilizando un sistema de HPLC (Thermo Separation Products, Holanda) equipado con una bomba cuaternaria (modelo P4000), membrana desgasificadora al vacío y autosampler (AS4000) con un loop de 100 µL de inyección conectado a una columna C18 Alltima (250 x 4,6 mm) de 5µm de tamaño de partícula (Alltech). El detector de arreglo de diodo (UV600LP Spectrasystem) se utilizó a 330 nm para la detección de tocoferoles. La fase móvil consistió en una mezcla isocrática de etanol:metanol 60:40 a 1 mL/min. Las curvas de calibración se realizaron con los estándares (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) preparados en el momento en etanol absoluto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la Figura 1 se pueden observar, a modo de ejemplo, los espectros de fluorescencia sincrónicos recolectados al analizar aceite de nuez durante los 50 días de su almacenamiento en la oscuridad a 25°C y 57% de HR, y cubierto con PCs de HMP con AA. Para ello se utilizó primeramente un offset ($\Delta\lambda$) de emisión-excitación de 20 nm. El espectro de fluorescencia sincrónico a $\Delta\lambda$ = 20 nm mostró principalmente dos picos importantes con un máximo a ≈ 308 nm y otro menor a ≈ 670 nm. Del mismo modo, se observó dichos máximos en todos los aceites aquí ensayados.

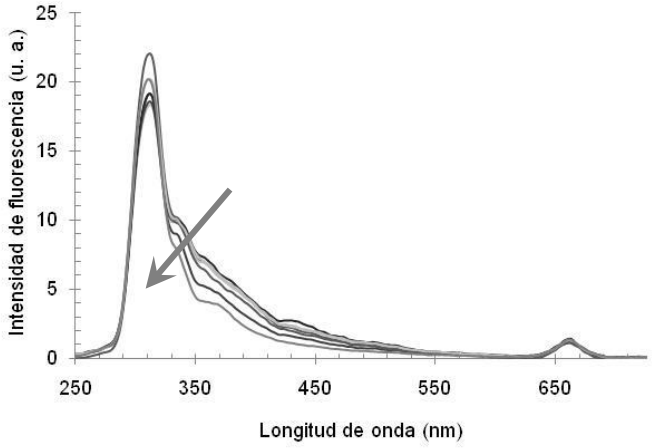


Figura 1: Espectros de fluorescencia sincrónicos obtenidos a $\Delta\lambda$ = 20 nm del aceite de nuez cubierto con películas de HMP conteniendo ácido L-(+)-ascórbico, recolectados durante los 50 días de almacenamiento a 25°C, en la oscuridad. El sentido de la flecha indica aumento del tiempo de almacenamiento.

En su trabajo previo, realizado sobre el estudio de aceite de oliva virgen durante el almacenamiento bajo distintas condiciones, Sikorska *et al*. (2008) también observaron en su espectro de fluorescencia sincrónico dos picos importantes a ≈ 301 nm y ≈ 666 nm. Dichos autores informaron que los principales compuestos fluorescentes identificados del aceite fueron los pertenecientes al grupo de los tocoferoles y clorofilas. Dentro del grupo de las clorofilas se podrían incluir las clorofilas a y b y las feofitinas a y b. Dichos pigmentos generalmente se encuentran presentes en los aceites "crudos", obtenidos directamente por extracción de las semillas, los cuales son luego removidos durante el procesamiento, por ejemplo, durante la refinación del aceite. Zandomeneghi *et al*. (2005) asignaron el pico de las clorofilas a una longitud de onda de emisión de 675 nm para los espectros de fluorescencia obtenidos de aceite de oliva. Por lo tanto, los picos con máximos a ≈ 308 nm y ≈ 670 nm aquí observados podrían ser atribuidos a los tocoferoles y a las clorofilas, respectivamente.

Por otro lado, no hay evidencia de formación de nuevos compuestos fluorescentes en los espectros sincrónicos de todos los sistemas aquí ensayados durante los 50 días de almacenamiento a 25°C (Figura 1). Sikorska *et al*. (2008) encontraron nuevos picos en sus espectros sincrónicos del aceite almacenado bajo la luz y tentativamente los asociaron con productos fluorescentes derivados de la foto-descomposición/foto-oxidación de las clorofilas u otros pigmentos. Sin embargo, éste no sería el caso del ensayo realizado en el presente trabajo, ya que el mismo se efectuó al resguardo de la luz. Éste podría ser uno de los posibles motivos de no haber encontrado diferencias significativas entre los niveles de intensidad de fluorescencia del pico asignado a las clorofilas dada la falta de descomposición de las mismas. Es sabido que los pigmentos (clorofilas, riboflavina, porfirinas, etc.) se transforman en pro-oxidantes en presencia de la luz al *quenchear* fotones (Pokorný, 2001). Además, la identificación de nuevos picos fluorescentes puede indicar la formación de otros productos de oxidación. Se ha demostrado que los aceites almacenados al resguardo de la luz principalmente contienen productos de oxidación primaria, mientras que aquellos que son expuestos a la luz contienen productos de oxidación secundarios. Estos productos pueden reaccionar con otros componentes del aceite y formar entonces compuestos fluorescentes (Sikorkska *et al*., 2008). Los productos primarios procedentes de la autooxidación son inodoros e insípidos (por ejemplo, los hidroperóxidos del ácido linoleico e hidroperóxidos en general). La calidad de un alimento comienza a alterarse cuando se producen compuestos volátiles secundarios a los cuales pertenecen sustancias con gran intensidad aromática,

característica que, inclusive a las pequeñas concentraciones a las que normalmente se encuentran, modifican muy fuertemente el olor y el sabor, como por ejemplo, compuestos carbonílicos aromáticos, dialdehído malónico, alcanos y alquenos (Belitz y Grosch, 1992).

En la Figura 2 se pueden observar los espectros sincrónicos obtenidos a $\Delta\lambda$=10 nm para las muestras de aceite de nuez cubiertas con PCs de HMP conteniendo AA. Se encontraron diferencias significativas en la intensidad de los picos asignados a los tocoferoles (≈ 308 nm) durante el almacenamiento del aceite. Dichos espectros presentaron varios picos en la zona atribuida a los tocoferoles y esto puede ser debido, probablemente, al efecto de la concentración de la muestra ya que no solo estaría presente el pico asignado a los tocoferoles sino también los picos correspondientes a otros compuestos presentes que también emiten en este rango de longitud de onda (Sikorska *et al*., 2005), teniendo así un efecto muy pronunciado la concentración utilizada para la medición, que en el presente caso fue el aceite puro sin diluir. Cuando se representan los valores obtenidos para dicho pico (≈ 308 nm) a partir del espectro sincrónico con $\Delta\lambda$ = 10 nm, es posible observar el efecto de la condición de almacenamiento de los aceites. Como se puede observar en la Figura 3, las muestras de aceite de nuez que permanecieron cubiertas con PCs de HMP con AA mantuvieron significativamente ($p < 0,001$), durante el período de almacenamiento, el nivel de "tocoferoles" siempre por encima del observado en las muestras cubiertas con PCs de HMP sin AA y en las muestras "control" (sin película), mostrando así la capacidad protectora de las películas antioxidantes desarrolladas. Cabe destacar que, en estas condiciones de almacenamiento, el tiempo de vida medio ($t_{1/2}$) del AA en estas películas constituidas por HMP fue de 83 días (Pérez *et al*., 2012), lo cual indica que durante los 50 días de almacenamiento a 25 ºC del presente trabajo, el nivel de AA no decayó significativamente.

Cuando el AA no estuvo presente en la formulación de las PCs, los niveles de "tocoferoles" del aceite fueron en general siempre menores al aceite protegido por películas de HMP con AA (p<0,001), aunque más cercanos (p<0,05) a los valores del control (sin PC). El uso de películas sin AA en el experimento demuestra la capacidad de barrera al oxígeno de las mismas.

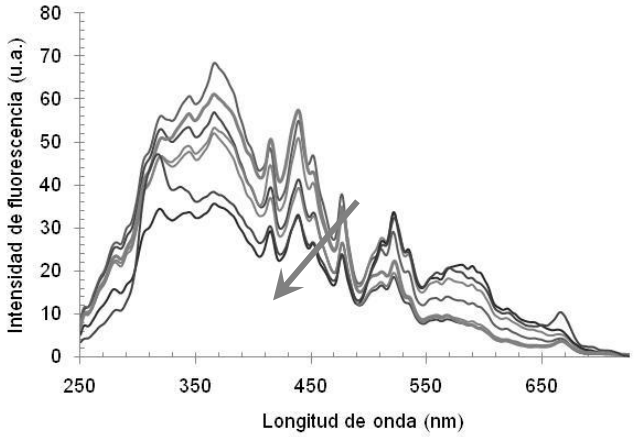


Figura 2. Intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (UA) a 308 nm $\Delta\lambda$=10 nm en función de tiempo de almacenamiento en oscuridad y 57% HR de los aceites de nuez. El sentido de la flecha indica aumento del tiempo de almacenamiento.

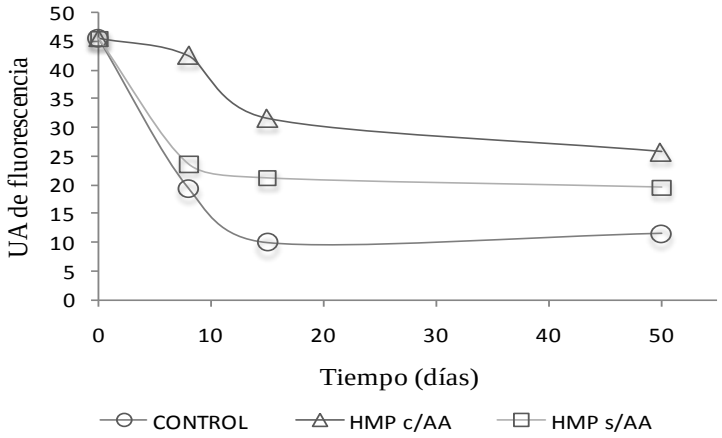


Figura 3. Intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (UA) a 308 nm en función de tiempo de almacenamiento en oscuridad y 57% HR de los aceites de nuez.

Para probar la relación cuantitativa entre la fluorescencia atribuida a los tocoferoles y el contenido real en las muestras de aceite de nuez se realizó el análisis de correlación (*Pearson*) entre la intensidad de fluorescencia a 308 nm y la concentración determinada analíticamente de vitamina E (isómero γ-tocoferol) para todos los aceites a lo largo del almacenamiento. En la Figura 4 se puede observar el contenido de γ-tocoferol en cada muestra de aceite de nuez a lo largo del almacenamiento, luego de su extracción y cuantificación por HPLC.

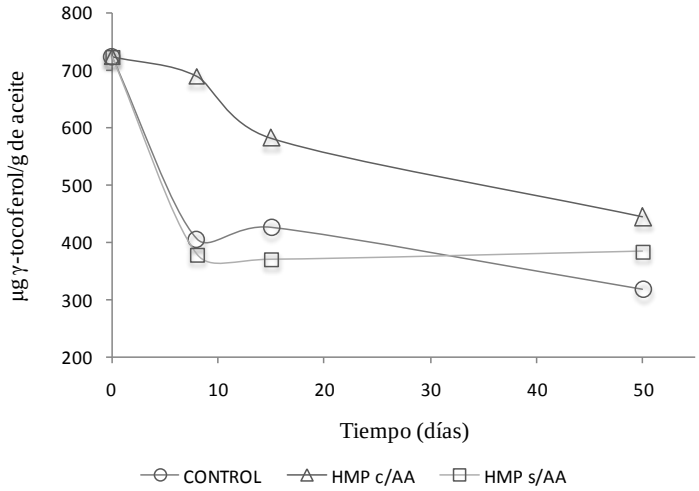


Figura 4. Contenido de γ-tocoferol en los aceites de nuez determinado por HPLC en función del tiempo de almacenamiento en oscuridad y 57% HR.

Se encontró un coeficiente de correlación de *Pearson* de 0,95 ($p < 0.05$) lo que indicaría que el pico observado a partir del espectro de fluorescencia sincrónico utilizando un $\Delta\lambda$=10 nm a 308 nm puede ser atribuido a la emisión de los tocoferoles, principalmente γ-tocoferol, isómero mayoritario de la vitamina E presente en los aceites de nuez. Este resultado muestra que el espectro de fluorescencia sincrónico podría ser utilizado para cuantificar tocoferoles luego de una apropiada calibración.

CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se pudo probar la actividad antioxidante de las PCs de HMP soportando AA. Se demostró así la utilidad de estas películas como interfases antioxidantes, protegiendo al alimento de la importante pérdida de vitaminas (tocoferoles) del aceite de nuez gracias a la presencia del AA en la matriz

polimérica, hecho que fue demostrado debido a que los aceites almacenados con PC pero sin AA en su formulación, no mantuvieron el nivel de tocoferoles más elevado durante el almacenamiento. De todas maneras, estas últimas demostraron capacidad de barrera al oxígeno. La presencia del AA retenido en la película, presente en la interfase película/aceite actuaría evitando la oxidación de los tocoferoles, tal como ocurre naturalmente con la dupla AA/tocoferol (Miková, 2001).

Por otro lado, se encontró una muy buena correlación entre las técnicas de fluorescencia y de cuantificación analítica por HPLC utilizadas para la determinación de vitamina E en los aceites. El presente estudio demuestra el potencial de la espectroscopía de fluorescencia sincrónica en el análisis del aceite de nuez. La rápida medición de fluorescencia podría utilizarse directamente para el monitoreo y detección temprana de los procesos oxidativos en el aceite de nuez, que acontecen durante el almacenamiento.

Finalmente la espectroscopia de fluorescencia es una técnica alternativa prometedora, o al menos una técnica complementaria a los métodos analíticos actuales, utilizada en la evaluación de la calidad del aceite.

BIBLIOGRAFIA

Amaral JS, Alves MR, Seabra RM, Oliverira BPP 2005. Vitamin E composition of walnuts (*Juglans regia* L.): a 3-year. Comparative study of different cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 5467-5472.

Atarés L, Pérez-Masiá R, Chiralt A 2011. The role of some antioxidants in the HPMC film properties and lipid protection in coated toasted almond. Journal of Food Engineering, 104: 649-656.

Bakkalbas E, Mentes O, Yilmaz OM, Javidipour I, Artik N 2012. Effects of packaging materials, storage conditions and variety on oxidative stability of shelled walnuts. LWT-Food Science and Technology, 46: 203-209.

Belitz HD, Grosch W 1992. Química de los alimentos. Segunda edición. Editorial ACRIBIA, Zaragoza (España).

Buttriss, JL Diplock, AT 1984. HPLC methods for vitamin E in tissues. In Methods in Enzymology, vol. 105, (Eds L. Parker and A.N. Glazer), Academic Press, New York, pp 131-138.

Han JH, Gennadios A 2005. Edible films and coatings: a review. In: Jung H. Han, (Ed.), Innovations in Food Packaging. London, Elsevier Ltd.; pag. 242.

Miková, K 2001. The regulation of antioxidants in food. In J. Pokorny, N. Yanishlieva, & M. Gordon (Eds.), Antioxidants in foods. Practical applications. Cambridge, England: CRC Press. Woodhead Publishing Limited, chapter 11.

Pereira JA, Oliverira I, Sousa A, Ferreira ICFR, Bento A, Estevinho L 2008. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. Food and chemical toxicology, 46, 2103-2111.

Pérez CD, Fissore EN, Gerschenson LN, Cameron RG, Rojas AM 2012. Hydrolytic and oxidative stability of L-(+)-ascorbic acid supported in pectin films: Influence of the Macromolecular Structure and Calcium presence. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60: 5414-5422.

Pérez CD, Flores SK, Marangoni AG, Gerschenson LN, Rojas AM 2009. Development of a high methoxyl-pectin edible film for retention of L-(+)-ascorbic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 6844-6855.

Pokorný, J 2001. Natural antioxidant functionality during food processing. Chapter 14, pp. 334. In: Antioxidants in Foods.

Sikorska E, Górecki T, Khmelinskii IV, Sikorski M, Zoziot J 2005. Classification of edible oils using synchronous scanning fluorescence spectroscopy. Food Chemistry, 89: 217-225.

Sikorska E, Khmelinskii IV, Sikorski M, Caponio F, Bilancia MT, Pasqualone A, Gomes T 2008. Fluorescence spectroscopy in monitoring of extra virgin olive oil during storage. International Journal of Food Science and Technology, 43: 52-61.

Zandomeneghi M, Carbonaro L, Caffarata C 2005. Fluorescence of vegetable oils: olive oils. Journal Agricultural and Food Chemistry, 53: 759-766.

AGRADECIMIENTOS.

Se agradece el apoyo financiero de la Universidad de Buenos Aires, CONICET, ANPCyT e INTA (PNLEC071021).

Evaluación de sanitizantes alternativos al hipoclorito de sodio para la desinfección de espinaca: calidad microbiológica y organoléptica.

Rubinstein A.[1], Jagus R.J.[1], Agüero M.V.[1,2]

1: Laboratorio de Microbiología Industrial: Tecnología de Alimentos, Fac. Ingeniería, UBA
2: CONICET.
mvaguero@di.fcen.uba.ar

Resumen: Se estudió el reemplazo del hipoclorito de sodio (H) en la desinfección de espinaca. Se ensayaron lavados utilizando: agua corriente (A) y soluciones de H (200ppm), ácido cítrico (C, 2%), natamicina (N, 0.2%) y té verde (T, 0.25%). Luego del lavado, las muestras fueron envasadas y almacenadas durante 6 días a 6-8ºC. Se evaluó la calidad microbiológica (BMA: bacterias mesófilas aerobias; HyL: hongos y levaduras) y organoléptica (color y textura). La carga microbiana inicial (BMA= 6.39log; HyL= 4.43log) se redujo entre 0.7 y 3 log luego de los lavados, con las mayores reducciones de BMA para H y C, y de HyL para A y H. Durante el almacenamiento, sólo las muestras lavadas con C mantuvieron bajos los recuentos, pero su calidad organoléptica presentó un deterioro significativo de la textura (hidrólisis, roturas en el tejido) y del color (amarillamiento extendido). Finalizado el almacenamiento, los recuentos microbianos de las muestras lavadas con H resultaron sin diferencias significativas respecto de las lavadas con N, pero estas últimas tuvieron mayor calidad organoléptica. El reemplazo del H por N permite obtener igual calidad microbiológica que las muestras lavadas con H pero mejor calidad organoléptica al finalizar el almacenamiento.

Palabras clave: hortalizas de hoja, calidad microbiológica, calidad organoléptica, antimicrobianos naturales, desinfección.

Abstract: The replacement of sodium hypochlorite (H) in the disinfection of spinach was studied. Washings were tested using water supply (A) and solutions of H (200ppm), citric acid (C, 2%), natamycin (N, 0.2%) and green tea extract (T, 0.25%). After washing, the samples were packed and stored for 6 days at 6-8 °C. Mesophilic aerobic bacteria (MAB) and yeast and molds (Y&M) were used as microbiological indices. Organoleptical quality was assessed through instrumental measurements of color and texture. The initial microbial load (MAB=6.39 log; Y&M=4.43log) fell between 0.7 and 3 log after washing, with the largest reductions in MAB for H and C solutions, and for A and H in the case of Y&M. During storage, only samples washed with C did not show increases in microbial counts, but their organoleptical quality showed a significant degradation with detriment in texture (hydrolysis) and color (extended yellowing). At the end of storage, microbial counts of samples washed with H were not significantly different from samples washed with N, but this presented better organoleptical quality. The replacement of H by N allows to obtain equal microbiological quality than samples washed with H but with better organoleptic quality but at the end of storage.

Keywords: Leafy vegetables, microbiological quality, organoleptical quality, natural antimicrobials, disinfection.

INTRODUCCIÓN

Los cambios registrados en las últimas décadas en el estilo de vida de los consumidores han llevado al auge en el consumo de hortalizas refrigeradas mínimamente procesadas (RMP) (Olaimat y Holley 2012, São José y Vanetti 2012, Sagong *et al.* 2011). Dos factores han sido determinantes en este proceso: el interés de los consumidores en incorporar vegetales a su dieta y la conveniencia que estos productos ofrecen debido a su rápida y sencilla preparación (Gupta *et al.* 2012, Sagong *et al.* 2011, Rico *et al.* 2007). Paralelamente, se ha registrado un notable aumento de enfermedades transmitidas por alimentos asociados al consumo de estos productos (Olaimat y Holley 2012, Taban y Halkman 2011, Warriner *et al.* 2009).

Entre las etapas de producción de hortalizas RMP, el lavado y desinfección tienen una importancia relevante debido a que esta es la única etapa donde la carga microbiana inicial puede ser reducida (Neal *et al.* 2012, São José y Vanetti 2012, Allende *et al.* 2006). El hipoclorito de sodio (NaClO) es el sanitizante más utilizado en la desinfección industrial (Ilic *et al.* 2012). Sin embargo, numerosos estudios han cuestionado su uso en

productos vegetales debido a la formación de productos carcinógenos y mutagénicos (Cobo-Molinos *et al.* 2008, Martín Diana *et al.* 2008). Esto ha impulsado la investigación y el desarrollo de nuevas estrategias de desinfección, buscando reemplazar los aditivos químicos utilizados en este proceso por otros más naturales que logren un efecto sanitario similar.

El uso de ácidos orgánicos (cítrico, láctico, ascórbico, entre otros) ha sido propuesto como una natural alternativa para el reemplazo del NaClO (Gupta *et al.* 2012, Neal *et al.* 2012, Allende *et al.* 2008). Estos compuestos inhiben el crecimiento de microorganismos a través de la disrupción de membrana celular, inhibición de reacciones metabólicas esenciales, estrés en la homeostasis de pH celular y acumulación de aniones tóxicos (Huang y Chen 2011).

En los últimos años se ha prestado especial interés a los compuestos antimicrobianos naturales, como las bacteriocionas, para reducir la carga microbiana de la materia prima y estabilizar los productos elaborados. Entre las bacteriocinas, la natamicina (piramicina) es un antifúngico producido por *Streptomyces natalensis* y considerado como un compuesto GRAS (Generally recognized as safe) por la FDA (Koontz y Marcy 2003). Es efectiva contra hongos y levaduras y actúa bloqueando el crecimiento de estos microorganismos a través de su unión con el ergosterol (Welscher *et al.* 2008).

Otras alternativas están asociadas al uso de polifenoles, contenidos en compuestos como el té verde. Este constituye una excelente fuente de antioxidantes y, a su vez, ha mostrado capacidad antimicrobiana en distintas matrices alimentarias (von Staszewski *et al.* 2011, Martín-Diana *et al.* 2008).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el reemplazo de hipoclorito de sodio por productos más naturales y seguros, evaluando la eficiencia para reducir la carga microbiana de la materia prima, afectando mínimamente la calidad organoléptica y logrando una adecuada vida útil.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima y preparación de muestras

Los estudios se realizaron utilizando espinaca (*Spinacea oleracea* L.) como materia prima. Los atados de espinaca fueron obtenidos en comercios minoristas de Capital Federal y transportados al laboratorio donde fueron cortados para descartar las raíces y la porción inferior del tallo. Luego, las hojas fueron mezcladas para lograr muestras homogéneas.

Una parte de la materia prima fue analizada en la primera hora luego de su arribo al laboratorio (muestras sin lavar) para caracterizar la calidad inicial. El resto del material, fue sometido a los tratamientos de lavado y desinfección correspondientes (ver apartado "Lavado y desinfección"). La materia prima tratada fue empacada y almacenada en las condiciones que se detallas en el apartado "Empaque y almacenamiento". Se analizó la evolución de la calidad del producto realizando muestreos a los 0, 3 y 6 días de almacenamiento.

Lavado y desinfección

Se ensayaron lavados por inmersión de 5 minutos utilizando diferentes soluciones: agua de red (A), hipoclorito de sodio (200ppm), ácido cítrico (2%p/v), natamicina (0.2%p/v) y extracto de té verde (0.25%pv). En todos los casos, la relación masa de producto a volumen de solución se mantuvo en 1:20 (Sagong *et al.* 2012). Durante la inmersión se agitó manualmente utilizando una cuchara. Luego del tratamiento, las muestras fueron retiradas de la solución, escurridas y centrifugadas en una centrífuga manual de cocina durante 30 segundos.

Los compuestos desinfectantes propuestos y sus concentraciones fueron seleccionados teniendo en cuenta estudios previos de otros autores (Neal *et al.* 2012, Hondrodimou *et al.* 2011, Sagong *et al.* 2011, Randazzo *et al.* 2009, Martín-Diana *et al.* 2008). Los reactivos que se utilizaron en la preparación de las soluciones desinfectantes fueron: Hipoclorito de sodio concentrado (55 g Cl/L) comercial (Ayudín®, Argentina), ácido cítrico anhidro (Anedra, Argentina), Delvocid® Salt (DSM, Holanda), té verde comercial (Chinese Good Shan Good Shui, China).

El extracto de té verde se preparó siguiendo la metodología descripta por von Staszewski *et al.* (2011). Brevemente, se pesaron 3,0 g de hojas de té, se molieron en molinillo de café doméstico y se agregaron a 100 mL de agua destilada caliente (95ºC) para lograr un extracto soluble al agua al 3% p/v. Esta infusión se mantuvo en un baño térmico a 95ºC durante 20 minutos y luego se enfrió hasta temperatura de refrigeración. Se mantuvo en frío hasta su utilización, momento en el que se diluyó hasta una concentración final de 0.25% p/v.

Empaque y almacenamiento

La materia prima lavada y desinfectada fue empacada en unidades de 20g. El material de empaque fue poliolefina (PD960, Cryovac®, Argentina) con una permeabilidad de 6000-8000 y 19000-22000 $cm^3.m^{-2}.24h^{-1}$ a O_2 y CO_2, respectivamente; y una permeabilidad al vapor de agua de 5-6 $g.cm^2.24h^{-1}$. Estas muestras fueron almacenadas en condiciones de refrigeración comercial (6-8ºC).

Indicadores de calidad

Para determinar la eficiencia de la operación de lavado y desinfección se utilizaron los siguientes indicadores de calidad:

Calidad microbiológica

Se caracterizó la calidad microbiológica a través de los recuentos de bacterias aerobias mesófilas totales (MA) y hongos y levaduras (HyL), siguiendo la metodología descripta por Agüero *et al*. (2011). Brevemente, 10 g de hojas fueron maceradas y homogenizadas en agua peptonada. Los recuentos microbianos de MA fueron llevados a cabo utilizando plate count agar (PCA, Biokar Diagnostics, Francia) para recuento total, incubando a 32-35ºC durante 48-72 h (ICMSF, 1983). Los recuentos de HyL se llevaron a cabo utilizando como medio de cultivo cloranfenicol glucosa agar (YGC, Biokar Diagnostics, Francia), incubando a 25ºC durante 5 días (ICMSF, 1983). Los recuentos se expresaron como $logUFC.mL^{-1}$. Los recuentos se realizaron por triplicado para cada tratamiento.

Calidad organoléptica

Se midió el color utilizando un colorímetro triestímulo MINOLTA (CM-508d, Japón). Se tomaron 5 hojas de cada tratamiento y se tomó el color en 5 puntos diferentes del lado adaxial de cada hoja. A partir de los valores L* (luminosidad o brillo), a* (rojo – verde) y b* (azul – amarillo), coordenadas del sistema Hunter Lab, se calculó el parámetro ángulo Hue (Hº) que determina el tono o matiz de la muestra. Valores entre 90 y 180º corresponden al espacio entre el amarillo y verde, color esperable para las muestras de espinaca.

Adicionalmente, se determinó la textura de las hojas de espinaca utilizando un ensayo de corte con un texturómetro TA.TX.Plus (Stable Micro Systems, Reino Unido), utilizando una adaptación del ensayo descripto por Sagong *et al.* (2011). Para ello se cortaron porciones rectangulares de 3 x 5 cm de las hojas en sentido longitudinal evitando la nervadura central. Tres porciones fueron utilizadas en cada ensayo para determinar la fuerza máxima de corte. Los ensayos se realizaron por quintuplicado para cada tratamiento. Se utilizó una celda de carga de 5 N, una velocidad de pre- y post-ensayo de 5 mm/s, velocidad de ensayo 1 mm/s avance. Los resultados se expresaron como Fmax por unidad de masa (N/g).

Análisis estadístico

Los resultados son expresados como valores medios obtenidos por el método de mínimos cuadrados, junto con sus desviaciones estándar (Kuehl 2001). Los resultados fueron analizados utilizando el software SAS, versión 9.0 (SAS Inc., 2002). Se utilizó el procedimiento GLM (Modelos lineales generales) para realizar el análisis de varianza (ANOVA) en el que se empleó como factor de variación: TRAT (tratamiento), TIEMPO (tiempo de almacenamiento) y la interacción entre estos factores. Las diferencias entre los tratamientos fueron determinadas mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer con un nivel de confianza del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los recuentos microbianos iniciales en hojas de espinaca sin lavar resultaron 6.39 ± 0.12 y 4.43 ± 0.20 log $UFC.mL^{-1}$ para bacterias aerobias mesófilas totales y para hongos y levaduras, respectivamente.

La **Figura 1** presenta los resultados obtenidos al realizar el recuento de estas poblaciones microbianas luego del lavado de la materia prima con diferentes soluciones sanitizantes (día 0) así como también la evolución de estos indicadores durante el almacenamiento refrigerado.

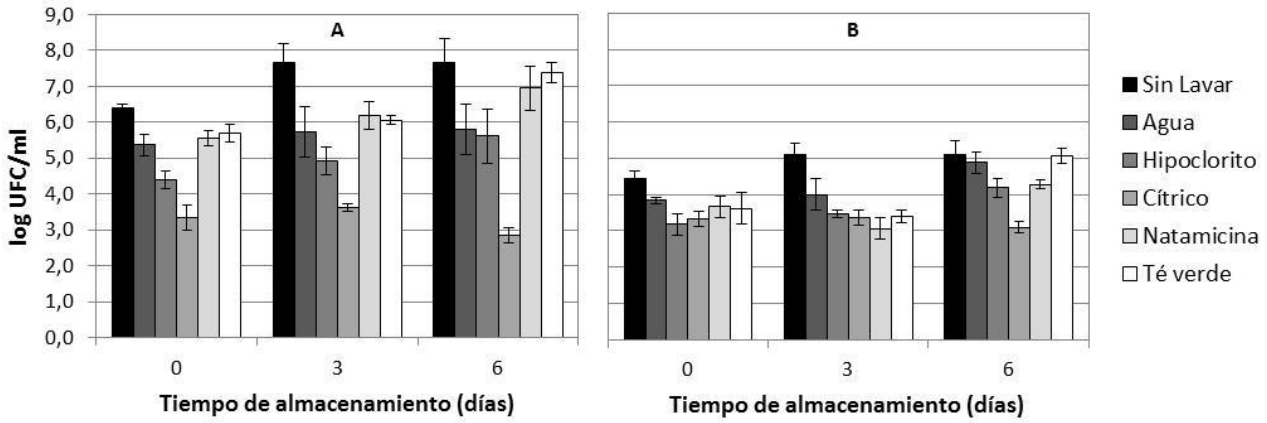


Figura 1: Recuentos de bacterias aerobias mesófilas (A) y hongos y levaduras (B) en hojas de espinaca sometidas a tratamientos de desinfección con diferentes sanitizantes y almacenadas en condiciones de refrigeración comercial.

El lavado de la materia prima por inmersión de 5 minutos en agua de red produce significativas reducciones de ambas poblaciones microbianas bajo estudio, especialmente en el caso de bacterias. Este resultado demuestra la importancia del lavado como operación preliminar en la elaboración de productos hortícolas mínimamente procesados.

El agregado de hipoclorito de sodio, en una concentración de 200ppm, tiene un efecto beneficioso para la calidad microbiológica inicial del producto ya que permite una reducción adicional de 1 ciclo log de bacterias, resultando una reducción de 1.99 log respecto de las muestras sin lavar (**Fig. 1A**). Este efecto es menos significativo para las poblaciones de hongos y levaduras (**Fig. 1B**), para las cuales el lavado con esta solución presenta una reducción adicional de 0.7 log respecto del lavado con agua de red (1.26 log respecto de las muestras sin lavar). El efecto del hipoclorito de sodio es bien conocido. Su poder desinfectante se debe a sus propiedades como oxidante fuerte (Artés *et al.* 2009). Es altamente efectivo para inactivar bacterias, hongos, levaduras y virus. Sin embargo, las reducciones en las poblaciones de microflora nativa de la superficie de hortalizas no son superiores a los 2 ciclos log con tratamientos de desinfección utilizando hipoclorito (Aruscavage *et al.* 2006, Sapers 2006).

La mayor reducción inicial de bacterias aerobias mesófilas (3.04 ciclos log) se obtuvo cuando la operación de lavado y desinfección se realizó con la solución de ácido cítrico. En el caso de hongos y levaduras, las reducciones logradas con este tratamiento no presentaron diferencias significativas con las obtenidas para el lavado con solución de hipoclorito de sodio. La utilización de los ácidos orgánicos sobre productos hortícolas está ampliamente difundida para la prevención de pardeamiento enzimático y no-enzimático, pero tiene también un efecto antimicrobiano siendo más eficiente contra bacterias que contra hongos y levaduras (Artés *et al.* 2009). Existen referencias de numerosos estudios acerca del lavado y desinfección con ácidos orgánicos y su efecto sobre la calidad microbiológica de tejidos vegetales (Jiang *et al.* 2004). Entre ellos, Gómez y Artés (2004) y Roura *et al.* (2003) encontraron que la desinfección de apio y lechuga, respectivamente, con soluciones de hipoclorito (100 ppm) puede ser reemplazada por un lavado con una solución de ácido cítrico (0,1 M) y ácido ascórbico (0,5 M).

El agregado de natamicina o extracto de té verde, en las concentraciones ensayadas en este estudio, no tuvo un efecto beneficioso adicional ya que las reducciones en los recuentos microbianos obtenidos con los lavados con estas soluciones no fueron significativamente diferentes de los obtenidos con lavados con agua de red. El efecto sobre la microflora nativa de estos tres tratamientos (A, N y T) se debe a un arrastre mecánico, favorecido por la agitación, de la solución en contacto con el material sustrato.

Durante el almacenamiento, las muestras sin lavar presentaron un incremento significativo de la microflora nativa bajo estudio alcanzando, al final del almacenamiento valores, de 7.66 y 5.09 log de bacterias mesófilas aerobias y hongos y levaduras, respectivamente.

La calidad microbiológica de la materia prima lavada con agua de red o con solución de hipoclorito de sodio mostró un comportamiento similar durante el almacenamiento. Las bacterias aerobias mesófilas tuvieron un leve incremento alcanzando valores de 5.80 y 5.62 log, respectivamente. Por su parte, los recuentos de

hongos y levaduras mostraron un incremento significativo al final del almacenamiento alcanzando valores de 4.88 y 4.18 log, respectivamente.

El tratamiento de lavado con la solución de ácido cítrico fue el que presentó la mejor performance respecto de este indicador, ya que las poblaciones microbianas se mantuvieron estables durante el almacenamiento, con recuentos bajos y similares a los detectados inmediatamente después de realizado el tratamiento.

Durante el almacenamiento, los recuentos de bacterias de las muestras lavadas con natamicina tuvieron un comportamiento similar al registrado para las muestras lavadas con A o H, con incrementos significativos. Al final del almacenamiento, los recuentos de bacterias en las muestras lavadas con N no fueron significativamente diferentes de las lavadas con H. En cambio, el efecto de esta bacteriocina sobre las poblaciones de hongos y levaduras fue más importante. En este caso, luego de una reducción en los recuentos durante los primeros días de almacenamiento, hacia el final del período analizado se observó un incremento en estas poblaciones, alcanzando valores similares a los detectados en las muestras lavadas con solución de hipoclorito de sodio. Otros estudios han verificado la eficiencia de la natamicina contra hongos y levaduras en diferentes sustratos alimenticios como quesos, suero de queso, embutidos, aceitunas (Arroyo-López *et al.* 2012, Mann y Beuchat 2008, Gallo *et al.* 2006, Delves-Broughton *et al.* 2004, Odds *et al.* 2003, Suloff *et al.* 2003), pero no se registran antecedentes en el uso de natamicina como antimicrobiano en hortalizas de hoja.

Finalmente, el extracto de té verde, no tuvo un efecto beneficioso adicional, ya que los recuentos de bacterias se incrementaron significativamente al final del almacenamiento superando los valores logrados en las muestras lavadas con agua de red o con hipoclorito de sodio. Este efecto también fue observado en las poblaciones de hongos y levaduras, en las que se alcanzaron valores de recuentos similares a los encontraron para muestras sin lavar.

La calidad organoléptica de hortalizas de hoja está constituida por diferentes componentes como apariencia fresca, color verde brillante, textura crujiente y ausencia de pardeamiento (Kader 2002). De estos aspectos, se evaluaron la textura y el color. La **Figura 2** presenta los cambios producidos en estos parámetros luego del tratamiento de lavado con diferentes soluciones sanitizantes y su evolución durante el almacenamiento refrigerado de las muestras.

La textura de hortalizas de hoja está determinada por la estructura de la pared celular y la presión interna de la célula o turgor (Ragaert *et al.* 2007). Una textura crujiente es asociada por el consumidor con un producto fresco y este es un importante atributo de calidad evaluado en el momento de compra. Numerosos estudios evalúan este parámetro a través de la fuerza máxima que debe ejercerse para cortar el tejido (Rico *et al.* 2007). Las muestras de espinaca sin lavar presentaron valores de fuerza máxima por unidad de masa de 19.36 ± 1.81 $N.g^{-1}$. La comparación de este valor con otros reportados por otros investigadores es dificultosa debido a la utilización de diferentes adaptaciones del test de corte, con diferentes celdas de carga, diferente manipulación de las muestras para la realización del ensayo, diferente variedad de materia prima, entre otros.

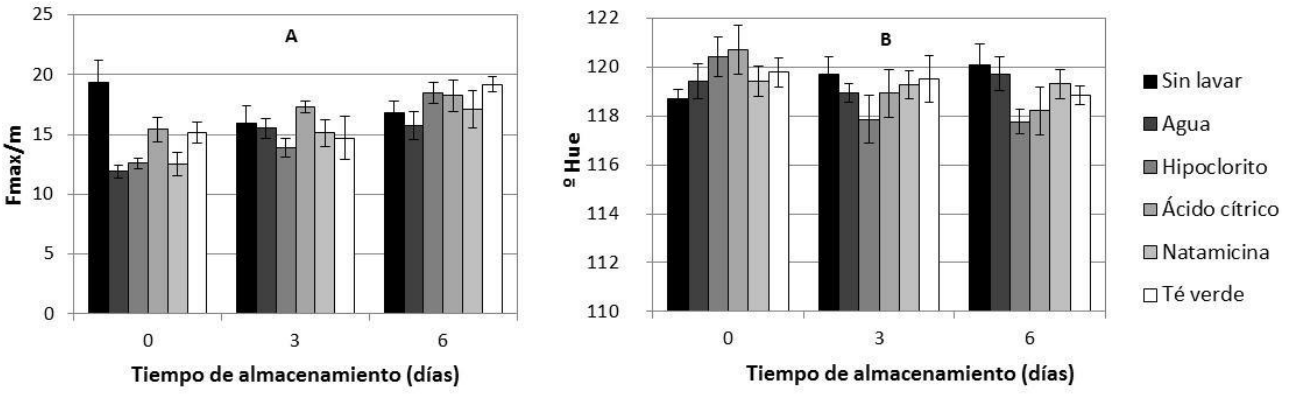


Figura 2: Textura (A) y color (B) de hojas de espinaca sometidas a tratamientos de desinfección con diferentes sanitizantes y almacenadas en condiciones de refrigeración comercial.

El lavado de la espinaca produjo una disminución significativa en la fuerza máxima de corte, cualquier haya sido la solución sanitizante utilizada en el tratamiento, alcanzando valores promedios de 12.33 ± 0.37, para los lavados con agua de red, hipoclorito de sodio y natamicina, y de 15.28 ± 0.17 para las soluciones de ácido cítrico y té verde. Esta disminución (entre 35 y 20 % respecto del valor para la espinaca sin lavar)

puede estar asociada al daño que se produce en el tejido debido a la agitación. La espinaca, como algunas variedades de lechuga, es un tipo de hortaliza delicada, muy sensible al daño mecánico (O'Connor-Shaw 2004). Como resultado, la fuerza máxima de corte disminuye ya que el tejido presenta una rotura previa de las paredes celulares.

Durante el almacenamiento de las muestras se observaron dos efectos contrarios en la fuerza máxima de corte. Por una parte, las muestras de espinaca sin lavar presentaron una disminución en este indicador especialmente durante los primeros días de almacenamiento. Este efecto puede deberse al inicio de los procesos de senescencia en el tejido que se manifiestan a través daños a nivel de membranas celulares y pared celular (Kader 2002). Por otra parte, las muestras lavadas (con cualquiera de los tratamientos evaluados) tuvieron un incremento en la fuerza máxima de corte (**Fig. 2A**).

El color es otro importante atributo sensorial y puede ser un factor crítico de calidad (Rico *et al.* 2007) ya que el consumidor puede rechazar un producto utilizando este criterio de selección. Se han desarrollado numerosos sistemas para las mediciones colorimétricas, siendo la mayoría de ellos convertibles entre sí. Sin embargo, el espacio de color Hunter Lab, utilizado en este trabajo, se caracteriza por una adecuación documentada para la cuantificación de cambios de color en hortalizas de hoja (Gnanasekharan *et al.* 1992). A partir de las coordenadas L a b de este sistema se calculó el parámetro ángulo Hue (^oH), utilizado en este trabajo como descriptor del color de espinaca. La espinaca sin lavar presentó valores iniciales de 118.69 ± 0.41, correspondiendo al rango de color amarillo a verde.

El lavado de la materia prima provocó un aumento en este parámetro posiblemente debido a la disminución de la tierra o material extraño sobre la hoja de espinaca (Sapers 2006). Durante el almacenamiento refrigerado se produjo una disminución significativa del color en las muestras lavadas con hipoclorito o con ácido cítrico, que se manifestaron mediante un amarillamiento extendido en el tejido.

CONCLUSIONES

Estos resultados refuerzan la idea de la necesidad de la aplicación de la operación de lavado y desinfección en espinaca ya que este proceso produce una significativa disminución de la carga microbiana inicial de la materia prima. El reemplazo del hipoclorito de sodio por ácido cítrico, en las concentraciones ensayadas, permite obtener una reducción microbiana inicial mayor, pero afecta significativamente la calidad organoléptica (principalmente el color) a través de una pérdida significativa del color verde característico del producto a lo largo del almacenamiento refrigerado. A su vez, el reemplazo del hipoclorito por natamicina ó el lavado con agua sin agregado de hipoclorito permite obtener igual calidad microbiológica y mejor calidad organoléptica al finalizar el almacenamiento.

BIBLIOGRAFÍA

Agüero MV, Ponce AG, Moreira MR, Roura SI. 2011. Lettuce quality loss under conditions that favor the wilting phenomenon. Postharvest Biology and Technology, 59: 124-131.

Allende A, Tomás-Barberán A, Gil MI. 2006. Minimal processing for healthy traditional foods. Trends in Food Science & Technology, 17: 513-519.

Allende A, Selma MV, López-Gálvez F, Villaescusa R, Gil MI. 2008. Role of commercial sanitizers and washing systems on epiphytic microorganisms and sensory quality of fresh-cut escarole and lettuce. Postharvest Biology and Technology, 49(1): 155-163.

Arroyo-López, F.N., J. Bautista-Gallego, V. Romero-Gil, F. Rodríguez-Gómez, and A. Garrido-Fernández. 2012. Growth/no growth interfaces of table olive related yeasts for natamycin, citric acid and sodium chloride. Int J. Food Microbiol. 155:257-262.

Artés F, Gómez P, Aguayo W, Escalona V, Artés-Hernández F. 2009. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. Postharvest Biology and Technology, 51: 287-296.

Aruscavage D, Lee K, Miller S, LeJeune JT. 2006. Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. Journal of Food Science, 71(8): R89-R99.

Cobo Molinos A, Abriouel H, Lucas R, Ben Omar N, Valdivia E, Gálvez A. 2008. Inhibition of *Bacillus cereus* and *B. weihenstephanensis* in raw vegetables by application of washing solutions containing enterocin AS-48 alone and incombination with other antimicrobials. Food Microbiology, 25(6):762-770.

Delves-Broughton J, Thomas LV, Doan CH, Davidson PM. 2004. Natamycin. p. 275-289. En: Davidson, PM, Sofos JN, Branen AL (eds.). Antimicrobials in Food. CRC Press. Boca Raton, Florida.

Gallo LI, Jagus RJ, Pilosof AMR. 2006. Modelling *Saccharomyces cerevisiae* inactivation by natamycin in liquid cheese whey. Brazilian Journal of Food Technology, 9(4): 311-316.
Gnanasekharan V, Shewfelt RL, Chinnan MS. 1992. Detection of color changes in green vegetables. Journal of Food Science, 57(1): 149-154.
Gómez P, Artés F. 2004. Ascorbic and citric acids to preserve quality of minimally processed green celery. pp. 369-373. En: Proceedings of IV Postharvest Iberian Symposium, Oeiras, Portugal.
Gupta S, Chatterjee S, Vaishnav J, Kumar V, Variyar PS, Sharma A. 2012. Hurdle technology for shelf stable minimally processed French beans (*Phaseolus vulgaris*): A response surface methodology approach. LWT-Food Science and Technology, 48(2):182-189.
Huang Y, Chen H. 2011. Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on baby spinach. Food Control, 22: 1178-1183.
ICMSF, 1983. Métodos recomendados para el análisis microbiológico en alimentos. pp.105-280. En: Microorganismos de los alimentos I. Técnicas de análisis microbiológicos. Acribia S.A. Zaragoza.
Ilic S, Raji A, Britton CJ, Grasso E, Wilkins W, Totton S, Wilhelm B, Waddell L, LeJune JT. 2012. A scoping study characterizing prevalence, risk factor and intervention research, published between 1990 and 2010, for microbial hazards in leafy green vegetables. Food Control, 23: 7-19.
Jiang Y, Pen L, Li J. 2004. Use of citric acid for shelf life and quality maintenance of fresh-cut Chinese water chestnut. Journal of Food Engineering, 63: 325-328.
Kader AA. 2002. Quality parameters of fresh-cut fruit and vegetable products. pp. 12-20. En: Lamikanra O. (ed.). Fresh-cut fruits and vegetables. CRC Press, Nueva York.
Koontz J, Marcy JE. 2003. Formation of natamycin: cyclodextrin inclusion complexes and their characterization. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 7106-7110.
Kuehl R. 2001. Diseño de experimentos. Thompson Learning International, México.
Mann DA, Beuchat LR. 2008. Combinations of antimycotics to inhibit the growth of molds capable of producing 1,3-pentadiene. Food Microbiology, 25: 144-153.
Martín-Diana AB, Rico D, Barry-Ryan C. 2008. Green tea extract as a natural antioxidant to extend the shelf-life of fresh-cut lettuce. Innovative Food Science and Emerging Technology, 9: 593-603.
Neal JA, Márquez-González M, Cabrera-Díaz E, Lucia LM, O'Bryan CA, Crandall PG, Ricke SC, Castillo A. 2012. Comparison of multiple chemical sanitizers for reducing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. Food Research International, 45: 1123-1128.
Randazzo CL, Pitino I, Ombretta Scifò G, Caggia C. 2009. Biopreservation of minimally processed iceberg lettuces using a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* wild strain. Food Control, 20: 756-763.
Ragaert P, Devlieghere F, Debevere J. 2007. Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. Postharvest Biology and Technology, 44: 185-194.
Rico D, Martín-Diana AB, Barat JM, Barry-Ryan C. 2007. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. Trends in Food Science and Technology, 18: 373-386.
Roura SI, Moreira MR, Ponce AG, del Valle CE. 2003. Dip treatments for fresh Romaine lettuce. Italian Journal of Food Science, 15(3): 405-415.
O'Connor-Shaw R. 2004. Salads and cold soups. En: Huin YH, Ghazala S, Graham DM, Murrell KD, Nip WK (eds.). Handbook of vegetable preservation and processing. Marcel Dekker Inc. Nueva York.
Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. Trends in Microbiology, 11(6): 272-279.
Olaimat A, Holley RA. 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. Food Microbiology, 32(1): 1-19.
São José JFB, Vanetti MCD. 2012. Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and *S. enterica typhimurium* on cherry tomatoes. Food Control, 24: 95-99.
Sagong HG, Lee SY, Chang PS, Heu S, Ryu S, Choi YJ, Kang DH. 2011. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. International Journal of Food Microbiology, 145: 287-292.
Sapers GM. 2006. Washing and sanitizing treatments for fruits and vegetables. En: Sapers GM, Gorny JR, Yousef AE (eds.). Microbiology of fruits and vegetables. CRC Press. Boca Ratón, Florida.
Suloff EC, Marcy JE, Hackney CR, Sumner SS, Bishop JR. 2003. Comparative study of a semisynthetic derivative of natamycin and the parent antibiotic on the spoilage of shredded Cheddar cheese. Journal of Food Protection, 66: 1499-1502.

Taban BM, Halkman AK. 2011. Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens?. Anaerobe. 17: 286-287.
von Staszewski M, Pilosof AMR, Jagus RJ. 2011. Antioxidant and antimicrobial performance of different argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. Food Chemistry, 125: 186-192.
Warriner K, Huber A, Namvar A, Fan W, Dunfield K. 2009. Recent advances in the microbial safety of fresh fruits and vegetables. Advances in Food & Nutrition Research, 57: 155-208.
Welscher YM, Napel HH, Balagué MM, Souza CM, Riezman H, Kruijff B. 2008. Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. Journal of Biological Chemistry, 283: 6393-6401.

AGRADECIMIENTOS
Este trabajo fue financiado por la Universidad de Buenos Aires y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

Estudio cinético en las modificaciones de los parámetros en los distintos estacionamientos de la yerba mate

Trela V.D., Holowaty S.A., Schmalko M.E.

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones, Posadas, Argentina. saholowaty@hotmail.com

Resumen: El objetivo del presente trabajo fue evaluar la cinética de modificación de las propiedades y componentes de la yerba mate durante la etapa de estacionamiento, mediante el ajuste a ecuaciones cinéticas integradas de orden cero, uno y dos. El procesamiento de la yerba mate involucra una serie de etapas dentro de las cuales se encuentra el estacionamiento, donde se producen reacciones que implican la pérdida del color verde intenso, y la variación del sabor y aroma. El conocimiento de la velocidad y de las condiciones con que ocurren estos cambios permitiría introducir mejoras en el control de calidad en esta etapa. Se han encontrado modificaciones en la mayoría los parámetros y componentes analizados, siendo las más significativas los parámetros de color, cafeína y fructosa, los cuales pudieron ajustarse a ecuaciones cinéticas, tanto de orden cero, uno, como así también a las de orden dos, con elevados coeficientes de regresión. Tanto en el estacionamiento acelerado como en el mixto, la mayor parte de los ajustes corresponden a las ecuaciones cinéticas de orden cero, en cambio, en el natural, se relacionan en mejor medida, a las de orden dos. Se comprobó que la constante de velocidad específica es mayor para todos los parámetros que se ajustan significativamente en el estacionamiento acelerado respecto a los estudiados en los otros dos depósitos, lo cual demuestra que las modificaciones se dan con mayor rapidez.

Palabras clave: yerba mate, estacionamiento, cinética.

Abstract: The objective of this research was to evaluate the kinetic changes of properties and components of yerba maté during aging by adjusting integrated kinetic equations to zero, one and two orders. The yerba maté processing has a series of stages including aging, where reactions involving the loss of green color, and the variation of flavor and aroma are produced. Knowledge of rate and conditions in which these changes happen let improvements in quality control at this stage. Changes in most of parameters and components analyzed were, most significant parameters color, caffeine and fructose, they were fit to kinetic equations of zero, one and two orders, with high regression coefficients. Both, in the controlled and temperature controlled aging most of the fitting corresponds to zero order kinetics equations, however, in the natural aging (without control), fit better to a second order equation. Specific constant rate is higher in the controlled aging than in the others two, which shows that the changes occur more rapidly.

Keywords: yerba maté**,** aging, kinetic

INTRODUCCIÓN

El procesamiento de la Yerba comprende 5 etapas: zapecado, secado, molienda gruesa o canchado, estacionamiento y molienda fina. La yerba mate es procesada en las dos primeras etapas hasta alcanzar un contenido de humedad de tal forma que no sufra transformaciones de deterioro. Luego se somete a una molienda gruesa (canchado), se colocan en bolsas de 40-50 Kg las que son almacenadas en depósitos para su estacionamiento.

El "estacionamiento natural" se lleva a cabo durante varios meses, en los cuales no se realiza casi ningún tipo de control de las condiciones ambientales. El tiempo de estacionamiento varía de 9 a 24 meses dependiendo del establecimiento. El "estacionamiento acelerado" se lleva a cabo en cámaras acondicionadas durante un período de hasta 60 días. Las condiciones usuales de trabajo son, en general, 60ºC de temperatura y 60% de humedad relativa. En algunas empresas se utiliza un sistema mixto de estacionamiento donde solo se controla la temperatura del aire pero no la humedad relativa, usualmente, temperaturas intermedias de 35 a 40ºC, donde la yerba permanece hasta 6 meses. El grado de estacionamiento del producto es controlado mediante análisis sensorial de catadores expertos que deciden cuando el mismo está en condiciones de ser consumido.

Durante el estacionamiento se producen reacciones que involucran la pérdida del color verde intenso y la variación del sabor de la yerba mate. Estos cambios percibidos merecen un estudio más profundo que aporte

al conocimiento de cómo varían en el tiempo los compuestos que se relacionan con la percepción de los sentidos de la visión y el gusto. El conocimiento de los cambios en la concentración de las sustancias relacionadas (cafeína, azúcares, color, etc.) constituirá un aporte para mejorar el procesamiento de la yerba mate de acuerdo al tipo de estacionamiento que cada industria esté aplicando.

Gran parte de los estudios de degradación de color (clorofilas) corresponden a las etapas de zapecado y secado donde las pérdidas de los pigmentos verdes alcanzan el 90 % (Schmalko, M.E. y Alzamora, S.M. 2001). Otros autores (Gomez Vara y col. 1979) encontraron que en los primeros 10 meses de estacionamiento natural el contenido de clorofila varió desde 1,36 a 0,25 mg/g ss. En el estacionamiento acelerado se han encontrado variaciones desde 1,07 a 0,33 mg/g ss durante los primeros 20 días (Lloret *et al.* 1992).

Los azúcares son otro grupo de compuestos que sufren variaciones durante el zapecado y secado. Gómez Vara y col. encontraron que la reducción llega al 34 %. Se ha reportado que se produce un aumento de sacarosa y una disminución de glucosa y fructosa (Känzig R.G. *et al.* 1987, Känzig R.G. *et al.* 1995, Paredes A.M. *et al.* 2000, Esmelindro *et al.*. 2002). Durante el estacionamiento natural (Gómez Vara *et al*.1979) encontraron que las variaciones en el contenido de azúcares totales no fueron significativas; pero en este estudio se emplearon técnicas analíticas de baja precisión, por lo que se considera que el estudio debe ser realizado nuevamente empleando técnicas de HPLC.

La disminución del contenido de cafeína también es importante durante el sapecado y secado alcanzando un 30 %. Sin embargo, a diferencia de los pigmentos y azúcares, la mayor variación se registra durante el secado (Schmalko y Alzamora, 2001). Bertoni *et al.* (1992) han informado que durante el estacionamiento natural las pérdidas de cafeínas llegan al 15 %.

La variación de las propiedades en los alimentos durante el almacenamiento puede explicarse utilizando ecuaciones cinéticas lineales de diferentes órdenes. La mayoría de los trabajos encontrados utilizan ecuaciones cinéticas de orden cero para describir el pardeamiento no enzimático en diferentes productos, como ser: cebollas deshidratadas (F. Kaymak-Ertekin and A. Gredik 2005), en jugos cítricos concentrados (H.S. Burdurlu *et al.* 2006) y de primer orden en la degradación de vitaminas, pigmentos y parámetros color en alimentos secos (P. Kumar and H. N. Mishra 2004, C. Niamnuy *et al*. 2008, M. S. Uddin *et al*. 2002, N. Sanjuán *et al*. 2004). Se encontraron, en menor medida, trabajos que utilizan el ajuste cinético de segundo orden para describir los cambios de color en manzanas deshidratadas (M. Cortés y A. Chiralt 2008) y en el pardeamiento no enzimático de cebollas deshidratadas (F. Kaymak-Ertekin y A. Gedik 2005).

El trabajo plantea ampliar el conocimiento actual de los cambios de color, cafeína, azúcares, acidez, humedad y otros compuestos, que ocurren cuando la yerba mate es sometida a los diferentes tipos de estacionamiento. El conocimiento de la velocidad y de las condiciones con que ocurren estos cambios permitiría introducir mejoras en el control de calidad de la etapa de estacionamiento. (Ramallo *et al.*1998, Sabatella *et al.* 2003, Schamlko *et al.* 2005). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la cinética de las modificaciones de ciertas propiedades y componentes de la yerba mate durante esta etapa, ajustándose las variaciones a las ecuaciones cinéticas integradas de orden cero, uno y dos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Las muestras se obtuvieron de establecimientos industriales de la provincia de Misiones de acuerdo al sistema que cada uno de ellos emplea: estacionamiento natural, acelerado y mixto. Se partió de una misma muestra de aproximadamente 150 kg proveniente de un secadero de la Provincia de Misiones, la misma se repartió entre los tres tipos de estacionamiento. Las muestras destinadas a cada tipo de estacionamiento se colocaron en 2 bolsas diferentes para poder realizar las determinaciones por duplicado. De cada depósito de estacionamiento se tomaron muestras al inicio y luego a tiempos variables de acuerdo a su extensión: cada 30 días para el estacionamiento natural durante 10 meses, cada 5 días para el estacionamiento acelerado durante 50 días y cada 10 días para el estacionamiento mixto durante los 3 primeros meses y luego cada 30 días hasta el término del mismo. Se obtuvieron en total 65 muestras: 20 de Estacionamiento Acelerado, 24 de Estacionamiento Mixto y 20 de estacionamiento natural, además de la muestra al inicio del estacionamiento.

Se procedió a separar hojas de palos en cada muestra tomada de los depósitos y se preparó cada muestra de ensayo molida destinada a los diferentes análisis (aproximadamente 0,600 kg) con un contenido de palo del 20% y se conservó a -20ºC a fin de evitar cambios entre el tiempo de la toma de muestra y el análisis.

Se realizaron las mediciones de color, extracto acuoso, contenido de humedad del producto sólido; así como, el contenido de azúcares, cafeína y sólidos solubles de la solución extraída simulando una mateada (AOAC 1990).

Metodología de Análisis

Contenido de humedad en las muestras molidas: Se determinó de acuerdo a la Norma IRAM 20503.

Medición de los parámetros de color: Se realizan mediciones de los parámetros de color L, a, b (Sistema HunterLab) de muestras extraídas, molidas, a cada tiempo de acuerdo al tipo de estacionamiento, con un medidor de color MiniScan® EZ HunterLab (Hunter Associates Laboratory, Inc.).

Determinación del Extracto Acuoso Total (EAT): Se determinó de acuerdo a la Norma IRAM 20510.

Determinación de sólidos solubles obtenidos de la Mateada (SSM): Se extrajeron los sólidos solubles simulando una mateada y se llevó a sequedad de acuerdo a la norma IRAM 20510.

Determinación de azúcares: la cuantificación se realiza por HPLC en columna amino, previa extracción en medio acuoso (IRAM 20532).

Determinación del contenido de cafeína en la Mateada: En una alícuota filtrada se determinará por HPLC con columna C18 y fase móvil acetonitrilo-agua en proporción 20:80, previa extracción de solubles en agua en forma de Mateada (IRAM 20512).

Análisis Estadísticos:

Los datos obtenidos a partir de los análisis de las 65 muestras, se ajustaron a ecuaciones cinéticas integradas de orden cero, uno y dos, utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurion 2009.

Modelos

Para describir la cinética de los resultados experimentales, es decir, para evaluar los cambios en los parámetros y propiedades de calidad estudiadas en el producto función del tiempo de estacionamiento, se utilizaron ecuaciones cinéticas de distintos órdenes de reacción. La variación cinética de parámetros en alimentos se puede expresar en forma general como

$$\frac{dC}{dt} = k.C^n. \quad (1)$$

Donde *dC/dt* representa la pérdida o ganancia de algún parámetro o propiedad estudiada, *k* representa la constante de velocidad específica, *C* es el parámetro o propiedad de calidad, determinada para cada muestra por los distintos análisis descritos anteriormente, y *n* es el orden de reacción. Para una ecuación cinética de orden cero, la ecuación integrada tiene la siguiente forma:

$$C - C_o = kt. \quad (2)$$

Para una ecuación cinética de primer orden, la ecuación integrada tiene la siguiente forma:

$$ln\frac{C}{C_o} = kt. \quad (3)$$

Las variaciones de las propiedades y parámetros estudiados en la yerba mate en función del tiempo, se ajustaron además a ecuaciones cinéticas de segundo orden, cuya forma integrada se describe por:

$$\left(\frac{1}{C} - \frac{1}{Co}\right) = kt. \quad (4)$$

Los valores de constante de velocidad de los parámetros estudiados fueron ajustados mediante regresión lineal simple.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Tablas 1, 2 y 3 se observan los resultados de los ajustes utilizando las ec. 2, 3 y 4 para los distintos parámetros en el estacionamiento acelerado, mixto y natural, respectivamente. En ellas se muestran los valores de la constante de velocidad específica (*k*) para cada componente o parámetro, así como los estadísticos R^2 y *p*. Las pendientes negativas de las constantes de velocidad específica (k) corresponden a la disminución del parámetro analizado en función del tiempo.

En el estacionamiento acelerado (Tabla 1), las concentraciones de cafeína y fructosa, se ajustaron mejor a un modelo cinético de orden cero, con valores de R^2 elevados y p<<0,05; los SSM y el parámetro de color "a" a un modelo de primer orden; la humedad, EAT, parámetro de color "L" y sacarosa, a un modelo de segundo orden y no resultaron significativas los ajustes del parámetro de color "b" y de glucosa.

Tabla 1: Constante de velocidad específica (k), parámetros estadísticos R^2 y p de los ajustes de orden cero, uno y dos en el estacionamiento acelerado.

	Cero			Uno			Dos		
Parámetros	***k***	**R^2**	**P**	***k***	**R^2**	**p**	***k***	**R^2**	**p**
Humedad	0,000266	52,54	0,0076	0,003749	54,97	0,0058	-0,0529491	57,28	0,0044
EAT*	0,077595	77,34	0,0002	0,001963	78,16	0,0001	-0,00005028	79,09	0,0001
Color L	0,078684	91,80	0,0000	0,001999	92,26	0,0000	-0,00005070	92,77	0,0000
Color a	0,0398647	98,30	0,0000	0,0359517	98,71	0,0000	0,00316997	0,08	0,9305
Color b	0,000103	0,19	0,8923	0,0000064	0,15	0,9043	-5,71429E-7	0,22	0,8846
SSM**	0,0403783	45,85	0,0156	0,001381	45,21	0,0166	-0,00004680	43,61	0,0194
Cafeína	-0,005087	95,68	0,0000	-0,008844	95,37	0,0000	0,015571	94,50	0,0000
Fructosa	-0,004528	94,64	0,0000	-0,008801	92,03	0,0000	0,017512	87,66	0,0000
Glucosa	0,001197	9,02	0,3429	0,0006272	7,84	0,3780	-0,0003260	6,66	0,4178
Sacarosa	0,021289	73,42	0,0004	0,008630	74,62	0,0003	-0,003533	75,58	0,0002

* EAT: Extracto Acuoso Total.

** SSM: Sólidos Solubles obtenidos de la Mateada.

En el estacionamiento mixto (Tabla 2), se determinó que la humedad, parámetros de color "L", "a", "b" y glucosa se ajustaron a un modelo de orden cero, con p<<0,05; el EAT, la cafeína y sacarosa a un modelo de segundo orden y no resultó significativa el ajuste de SSM.

La cafeína y los parámetros de color "L" y "b", presentaron ajustes significativos con los tres modelos cinéticos, superaron los valores de R^2 del 87% y los valores p fueron mucho menores a 0,05.

La humedad, EAT, fructosa y glucosa presentaron coeficientes de regresión entre 30 y 70 %. Esto puede deberse a la pequeña variación entre los puntos al inicio y al término del estacionamiento, lo cual influye en el método de ajuste.

Tabla 2: Constante de velocidad específica (k), parámetros estadísticos R^2 y p de los ajustes de orden cero, uno y dos en el estacionamiento mixto.

	Cero			Uno			Dos		
Parámetros	***k***	**R^2**	**P**	***k***	**R^2**	**p**	***k***	**R^2**	**p**
Humedad	-0,000052	36,31	0,0293	-0,000857	35,33	0,0322	0,0140001	34,10	0,0361
EAT*	0,0291056	34,98	0,0332	0,0007330	37,04	0,0273	-0,000018	38,88	0,0228
Color L	0,0452026	90,59	0,0000	0,0011198	90,03	0,0000	-0,000027	89,09	0,0000
Color a	0,0169492	95,23	0,0000	0,0137674	87,91	0,0000	0,0117247	8,95	0,3208
Color b	0,005722	89,41	0,0000	0,0004022	89,29	0,0000	-0,000028	88,92	0,0000
SSM**	-0,007426	19,05	0,1359	-0,000276	19,32	0,1329	0,000010	19,61	0,1296
Cafeína	-0,002390	87,79	0,0000	-0,004685	90,75	0,0000	0,009589	92,46	0,0000
Fructosa	-0,000578	37,12	0,0271	-0,001032	37,14	0,0270	0,001849	36,76	0,0280
Glucosa	-0,007765	66,09	0,0007	-0,006308	64,75	0,0009	0,005361	62,50	0,0013
Sacarosa	0,006249	63,57	0,0011	0,002566	64,66	0,0009	-0,001062	65,53	0,0008

* EAT: Extracto Acuoso Total.

** SSM: Sólidos Solubles obtenidos de la Mateada.

Tabla 3: Constante de velocidad específica (k), parámetros estadísticos R^2 y p de los ajustes de orden cero, uno y dos en el estacionamiento natural.

	Cero			Uno			Dos		
Parámetros	***k***	**R^2**	**P**	***k***	**R^2**	**p**	***k***	**R^2**	**p**
Humedad	0,000068	27,64	0,0792	0,000893	29,65	0,0672	-0,011925	31,77	0,0563
EAT*	-0,004628	29,72	0,0668	-0,00012	30,99	0,0601	0,000003	31,62	0,0570
Color L	0,020369	96,58	0,0000	0,000516	96,67	0,0000	-0,000013	96,85	0,0000
Color a	0,010778	98,86	0,0000	0,007977	95,56	0,0000	0,009806	27,02	0,0832
Color b	0,000862	17,53	0,1755	0,000060	16,70	0,1871	-0,000004	15,83	0,2002
SSM**	0,005144	51,96	0,0082	0,000179	52,47	0,0077	-0,000006	52,25	0,0079
Cafeína	-0,000298	93,27	0,0000	-0,000465	92,66	0,0000	0,000729	91,99	0,0000
Fructosa	0,000141	19,50	0,1506	0,000209	18,76	0,1596	-0,000309	17,89	0,1707
Glucosa	-0,004116	83,83	0,0000	-0,003345	85,39	0,0000	0,002848	86,87	0,0000
Sacarosa	0,003763	66,62	0,0012	0,001516	68,41	0,0009	-0,000617	70,00	0,0007

* EAT: Extracto Acuoso Total. ** SSM: Sólidos Solubles obtenidos de la Mateada.

En el estacionamiento natural (Tabla 3), tanto el parámetro de color "a" como la concentración de cafeína se ajustaron mejor a una cinética de orden cero; los SSM a una de primer orden; parámetro de color "L", concentración de sacarosa y glucosa a una cinética de segundo orden y no resultaron significativas los ajustes de humedad, EAT, parámetro de color "b" y fructosa.

Los ajustes de la mayor parte de los parámetros analizados en este ultimo tipo de estacionamiento, excepto los parámetros de color, se obtuvieron valores de R^2 inferiores al 50%, aún con valores $p<0,05$. Esta falta de ajuste puede deberse a variabilidad causada en el momento de las determinaciones de los parámetros.

Los parámetros que se ajustaron significativamente a modelos de orden cero en los tres depósitos estudiados son: color L, color a, cafeína, EAT, fructosa, los cuales muestran constantes de velocidad específica que disminuyen según el tipo de estacionamiento. Se observó que los mayores valores de *k* se dan en el estacionamiento acelerado, en menor medida en el mixto y por último en el natural, aún cuando los ajustes para EAT y fructosa no resultan significativos en el natural. La variación de componentes que se ajustaron a reacciones cinéticas de orden cero significa que la velocidad de la reacción es independiente de la concentración de las sustancias reaccionantes, sino que depende de otros factores limitantes, como ser: concentración de enzimas, minerales, etc.

Los resultados muestran un comportamiento esperado de las constantes de velocidad específica, ya que se obtuvieron valores más elevados en el estacionamiento acelerado, debido al empleo de temperaturas mayores, respecto al mixto y natural. Esto indica que las modificaciones de los componentes estudiados varían con mayor rapidez con el incremento de la temperatura de los depósitos. El mismo comportamiento se observó en los ajustes a ecuaciones de primer orden para los mismos parámetros en estudio, la cual sucede cuando la reacción depende de la concentración de un solo componente, que se descompone en uno o más productos. En este caso, el mecanismo de reacción se da por difusión y se podría describir por la Primera Ley de Fick para la cafeína, la cual se pierde por evaporación, y lo hace con mayor velocidad en el estacionamiento acelerado.

En las Fig 1, 2 y 3 se muestran los mejores ajustes obtenidos al utilizar las distintas ecuaciones (orden cero, uno o dos), las cuales se refieren a las mediciones de concentración de cafeína y de los parámetros de color "L" y "a", respectivamente. En todos estos casos, dichos ajustes, presentaron un coeficiente de regresión lineal mayor al 90%. El periodo de análisis fue de 60, 180 y 300 días para los estacionamientos acelerado, mixto y natural, respectivamente.

En la Fig. 1, se observa el ajuste cinético de la variación del contenido de cafeína en función del tiempo, en los tres tipos de estacionamientos. Los ajustes corresponden a ecuaciones cinéticas de orden cero para el caso de los estacionamientos acelerado y natural, y de orden dos, para el mixto. Ademas, demuestra que las mayores pérdidas de este componente ocurre en los estacionamientos acelerado y mixto, debido las condiciones ambientales utilizadas. En los resultados de los ajustes, representados en las tablas, se puede observar que la constante de velocidad específica es mayor en el estacionamiento acelerado, indicando una mayor velocidad de disminución de la concentración de cafeína.

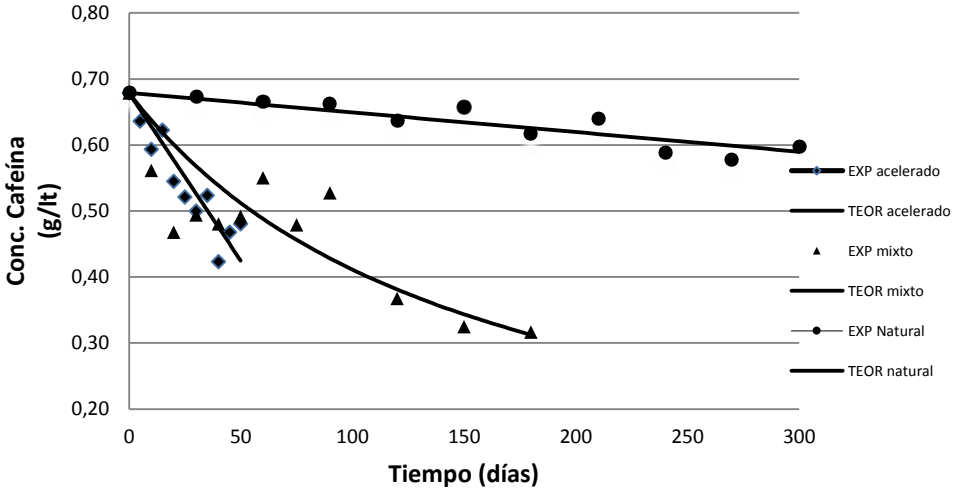


Figura 1. Ajuste cinético de la concentración de Cafeína (g/l) en función el tiempo para cada tipo de estacionamiento.

Para el caso del parámetro de color "L" (Fig. 2), los valores se ajustaron a ecuaciones cinéticas de orden dos tanto en el estacionamiento acelerado como el natural, obteniendo un ajuste de orden cero para el mixto. La constante de velocidad específica es mayor para el caso del estacionamiento acelerado, indicando un cambio más brusco en este parámetro, reflejado en una variación del producto desde un color más oscuro hacia uno más claro. De todas maneras, las mediciones indican que al final de la etapa de estacionamiento se obtienen productos similares, indistintamente del tipo de estacionamiento utilizado, ya que no hay diferencias de las determinaciones en los puntos finales.

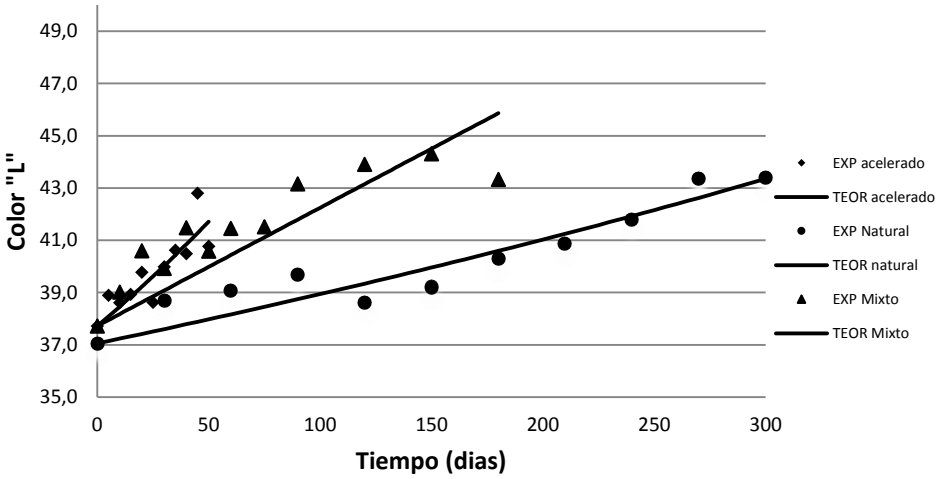


Figura 2. Ajuste cinético del parámetro de color "L" en función del tiempo para cada tipo de estacionamiento.

Finalmente, el parámetro de color "a", se ajustó mejor a una ecuación de orden cero en los tres tipos de estacionamientos. La velocidad con la que aumenta este parámetro de color, como se puede observar en la figura 3, es mucho mayor en el estacionamiento acelerado, teniendo una constante de velocidad especifica igual a 0,0398647 $dias^{-1}$ en comparación con valores de 0,0169492 y 0,010778 $dias^{-1}$ para el mixto y natural, respectivamente. Esta modificación indica el cambio de color verde intenso que posee la yerba mate antes de someterla al estacionamiento al verde mucho mas claro al final de esta etapa del procesamiento. A diferencia de lo que ocurre con el parámetro de color L, se observa en este caso que los puntos finales de las mediciones en cada uno de los estacionamientos son diferentes, lo cual revela claramente que en el

estacionamiento natural se obtiene un producto final de color verde mucho más claro que en el obtenido en el mixto y acelerado.

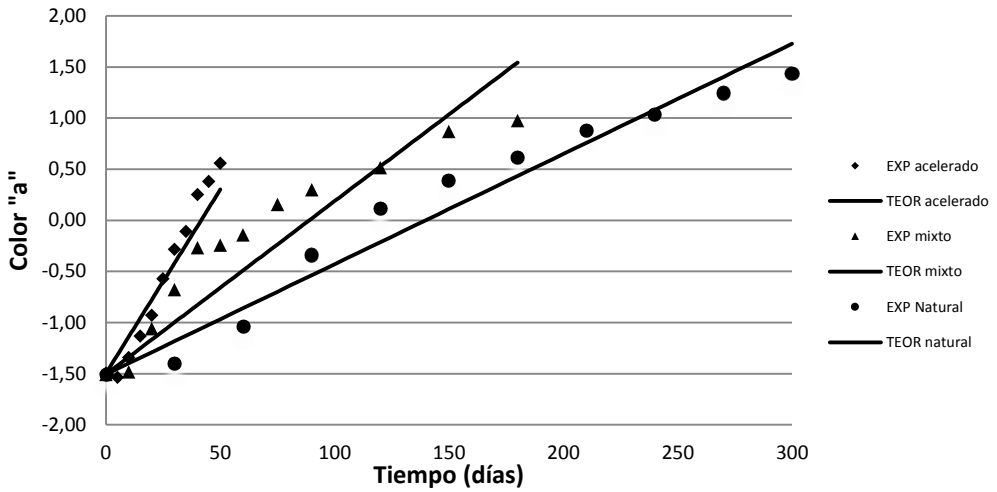


Figura 3. Ajuste cinético del parámetro de color "a" en función del tiempo para cada tipo de estacionamiento

Los resultados demuestran que la concentración de los azucares durante el periodo de estacionamiento de la yerba mate disminuyen en diferentes medidas. El comportamiento es similar a la concentración de cafeína, ya que los valores de las constantes de velocidad específica son mayores en el estacionamiento acelerado y menores en el natural, como consecuencias de la temperatura y humedad relativa empleadas en los depósitos. En cuanto a los ajustes cinéticos, para los casos de la glucosa en el estacionamiento acelerado y la fructosa en el mixto, no fueron significativos.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que la cinética de degradación de los componentes y propiedades de la yerba mate durante la etapa de estacionamiento puede ajustarse significativamente a ecuaciones de orden cero, uno o dos. Resultaron en menor medida, los ajustes de orden uno.

En la mayoría de los casos, no coincidió el orden de ajuste del mismo parámetro en los tres tipos de estacionamiento.

Tanto en el estacionamiento acelerado como en el mixto, la mayor parte de los ajustes corresponden a las ecuaciones cinéticas de orden cero, en cambio, en el natural, se relacionan en mejor medida, a las de orden dos.

Se comprobó que la constante de velocidad especifica es mayor para todos los parámetros que se ajustan significativamente en el estacionamiento acelerado respecto a los estudiados en los otros dos depósitos, lo cual demuestra que las modificaciones se dan con mayor rapidez, especialmente en las concentraciones de cafeína, azucares y parámetros de color. Esto se debe principalmente a las condiciones de estacionamiento que se utilizan en este depósito, temperaturas elevadas y humedad relativa controlada durante un corto periodo de tiempo.

BIBLIOGRÁFIA

AOAC.1990. Official methods of analysis, Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. USA., 62.

Bertoni, M.H.; Prat Krikum, S.D.; Känzig, R.G. y Cataneo, P. 1992. Hojas frescas de Ilex paraguariensis St. Hil.-III-Influencia de las distintas etapas del proceso tradicional de elaboración de la Yerba Mate (zapecado, secado+canchado y estacionamiento) sobre la composición de la hoja fresca del Clon 44/75, cosecha 1988. Anales de la Asoc. Química Argentina 80, 403-501.

Burdulu, H.S.; Kukay, N.; Karadeniz, F. 2006. Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. Journal of Food Engineering 74, 211-216.

Cortés M. y Chiralt A. 2008. Cinética de los cambios de color en manzanas deshidratadas por aire fortificada con vitamina E. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. ISSN: 0121-4004. Volúmen 15, número 1. 8-16. Universidad de Antioquia, Medellin, Colombia.

Esmelindro, M.C.; Toniazzo, G.; Waczuk, A.; Dariva, C.; de Oliveira, D. 2002. Caracterizacao físico-química da erva-mate: Influencia das etapas do processamento industrial. Ciencia e Tecnología de Alimentos 22 (2), 1-8.

Gomez Vara, M.E.; Brieux, J.A. y Avanza, J.R. 1979. Investigaciones sobre la tecnología de la Yerba Mate-Informe APRYMA, 1-226.

IRAM 20503. 1995. Instituto de Racionalización de Materiales. Yerba Mate: Determinación de la pérdida de masa a 103°C.

IRAM N° 20510, Instituto Argentino de Racionalización de Materiales- Norma 20510: Yerba Mate: Determinación del Extracto Acuoso. 1995

IRAM Nº 20512, Instituto Argentino de Racionalización de Materiales. Norma 20512: Yerba Mate: Determinación del Contenido de Cafeína. 2000.

IRAM Nº 20532. Instituto Argentino de Racionalización de Materiales. Norma 20532: Yerba Mate: Determinación de Sacarosa y glucosa por HPLC 2004.

Kaymak-Ertekin, F. and Gedik A. 2005. Kinetic modelling of quality deterioration in onions during drying and storage. Journal of Food Engineering 68, 443-453.

Känzig, R.G. y Reta, M.R. 1987. Determinación cualitativa de aminoácidos en Yerba Mate verde y estacionada. Revista de la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Misiones 5, 8-12.

Känzig, R.G.; Valdez, E.C.; Paredes, A.M. y Schoch, M. 1995. Comportamiento de la glucosa y la sacarosa en el proceso de elaboración de la Yerba Mate. Erva-Mate: Biología e Cultura no Cone Sul. Editora da Universidade -Universidad Federal do Rio Grande do Sul. Brazil, 406.

Kumar, P.; Mishra, H.N. 2004. Storage stability of mango soy fortified yoghurt powder in two different packaging materials: HDPP and ALP. Journal of Food Engineering 65, 569-576.

Lloret, M.A.; Schmalko, M.E.; Känzig, R.G. 1992. Clorofila en Yerba Mate. Degradación durante el Estacionamiento Acelerado. I Reuniao Técnica do Cone Sul Sobre a Cultura da Erva - Mate), del 2 al 4/09/92.

Mazza, A. y Schmalko, M.E. 2006. Variación de las isotermas de adsorción de la yerba mate durante el estacionamiento –. 4° Congreso Sudamericano de la Yerba Mate. Posadas, 5 al 8/11/06, 19-24.

Niamnuy, C.; Devahastin, S.; Soponronnarit, S. and Vijaya Raghavan, G.S. 2008. Kinetics of astaxanthin degradation and color changes of dried shrimp during storage. Journal of Food Engineering 87, 591-600.

Paredes, A.M.; Valdez, E.C.; Nuñez, J.C.; Känzig, R.G. 2000. Variación de los hidratos de carbono durante el secado de la Yerba Mate. Anales del 2° Congreso Sul-Americano da Erva-Mate, Encantado 19 al 23/11/00, Brasil, 182-185.

Ramallo, L.A.; Smorccewski, M.; Valdez, E.C.; Paredes, A.M. y Schmalko, M.E. 1998. Contenido nutricional del extracto acuoso de la Yerba Mate en tres formas diferentes de consumo. La Alimentación Latinoamericana 225, 48-52.

Sabatella, P; Pokolenko, J.J. y Schmalko, M.E. 2003. Estudio de la velocidad de extracción de solubles en mezclas de Yerba Mate. Jornadas de Investigación Científico-Tecnológicas de la Universidad Nacional de Misiones, Posadas, 30 al 31/10/03. Libro de Resúmenes, 291.

Sanjuán, N.; Bon, J.; Clemente, G.; Mulet, A. 2004. Changes in the quality of dehydrated broccoli florets during storage. Journal of Food Engineering 62, 15-21.

Schmalko, M.E. y Alzamora, S.M. 2001. Color, chlorophyll, caffeine and water content variation during Yerba Maté processing. Drying Technology 19, 599-610.

Schmalko, M.E.; Ramallo, L.A.; Herrera, J.L.; Valdez, E.C.; Paredes, A.M.; Morawicki, R.O.; Grosso, S.M.; Smorczewski, M.; Benitez Britez, S. y Escalada, A. 1995. Programa Eco Mate. Reconocimiento de Calidad. Análisis de Composición General, Minerales y Vitaminas en yerba mate. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones.

Schmalko, M.E.; Scipioni, P.G. y Ferreyra, D.J. 2005. Effect of Water Activity and Temperature in Color and Chlorophylls Changes in Yerba Maté Leaves. International Journal of Food Properties 8, pp. 313-322.

Statgraphics. Centurion XV. Statpoint Technologies, Inc. Warrenton VA, U.S.A. 2009.

Surkan, S. A.; Albani, O. y Ramallo, L.A. 2009. Influence of Storage Conditions of Sensory Shelf Life of Yerba Mate. Journal of Food Quality 32, 58-72.

Uddin M.S.; Hawlader, M.N.A.; Ding, L.; Mujumndar, A.S. 2002. Degradation of ascorbic acid in dried guava during storage. Journal of Food Engineering 51, 21-26.
Woniatczuk, M.I. y Schmalko, M.E. 2005. Estudio de la Variabilidad de los Parámetros de Calidad de la Yerba Mate Elaborada en Diferentes Establecimientos. X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Mar del Plata 18 al 20 de Mayo de 2005(en CD).

Métodos de prevención del deterioro de zanahoria mínimamente procesada

Vasco M.F.1, Monti M.C.1, Agnelli M.E.2

1: UNMdP Fac. Cs. Agrarias, Balcarce. Argentina.
2: EEA INTA Balcarce, CONICET.
agnelli.miriam@balcarce.inta.gov.ar

Resumen: Se determinó la efectividad del escaldado por microondas (M2: W5-90´´) para retardar el deterioro nutritivo y sensorial de zanahorias trozadas, respecto del escaldado tradicional (M1: 100ºC-30´´), en muestras almacenadas a 4°C, utilizando una muestra sin escaldar como control (MC). Inicialmente ambos tratamientos disminuyeron significativamente la actividad de la POD respecto de MC, siendo para estas condiciones, menor con M2. Durante el almacenamiento, esta continuó disminuyendo en las muestras tratadas. Por el contrario, la de MC aumentó en forma continua. Tanto el contenido de fenoles totales como el de β carotenos no mostraron diferencias significativas con MC inicialmente ni durante el almacenamiento, manteniéndose en valores constantes y similares en todas las muestras. Visualmente, M1 presentó apariencia cercana al producto cocido mientras que M2 resultó similar al fresco. Además M1 exhibió mayor exudado y pérdida de turgencia que M2. MC presentó lignificación superficial, pérdida de color y aroma con los días. La pérdida de peso debida al escaldado fue mayor en M1 que en M2, tanto inicialmente como durante el almacenamiento.

Palabras clave: escaldado, microondas, hortalizas refrigeradas, antioxidantes, calidad sensorial.

Abstract: The aim of this study was determine microwave blanching effectiveness to retard nutritional and organoleptic deterioration in sliced carrots as regards the traditional blanching in hot water. Carrots purchased in the local market, were selected according to its diameter (≈2 cm), washed in chlorinated water, peeled and sliced into 1 cm. One portion was blanched in water at 100ºC during 30´´ (M1). The other portion was blanched in a microwave at medium power (400 W) during 1:30´´ (M2). After each treatment, samples were immediately cooled, packed in PEBD bags and store at 4 °C for seven days. Fresh slices without treatment were also stored as control (MC). Loss of weight, appearance, peroxidase (POD) activity, β-carotenes and phenolic compounds contents were measured during storage in the three carrot batches. POD activity diminish in the same extent and remains constant the storage period. while POD activity of MC increased continuously. Phenolic compounds and β-carotenes contents showed no changes during storage in all the cases. Visual appearance presented some differences as M2 looks like fresh after 7 days. Weight loss was negligible for M2. In brief, microwave blanching resulted more effective than the traditional one as samples presents a better aspect and flavor than those blanched in water.

Keywords: blanching, microwave, refrigerated vegetables, antioxidants, sensory quality

INTRODUCCIÓN

Actualmente los consumidores buscan productos saludables y de alta calidad nutricional y requieren presentaciones que les resulten prácticas a la hora de elaborar las comidas. La aparición de productos mínimamente procesados está asociada a estos cambios en los hábitos de consumo. Estos productos, que presentan un valor añadido y una alta calidad nutritiva y sensorial, generalmente se consumen crudos o con un tratamiento térmico suave. Por este motivo, resulta imprescindible conocer el efecto de las distintas tecnologías de conservación de su calidad.

Cualquiera sea el proceso elegido para la conservación, después del lavado y las manipulaciones de cortado, los productos frutihortícolas deben someterse a una etapa de escaldado que tiene como principal objetivo llevar a cabo la inactivación de enzimas (causantes de malos olores, malos sabores y cambios de color), eliminación de aire ocluido, fijación de color y reblandecimiento del tejido como consecuencia del estrés oxidativo que sufren principalmente durante el cortado que conducen a cambios tanto en el contenido como en la composición de los componentes bioactivos (Lindley,1998; Chen and Djuric, 2001).

La zanahoria, es una de las hortalizas de mayor preferencia, debido a su versatilidad en los usos culinarios y sus componentes nutritivos tales como fitonutrientes y fibra dietética. Dicho producto es particularmente rico en compuestos antioxidantes como los fenólicos (Heinonen 2002) y los β-carotenos. Se destacan

particularmente estos últimos por ser los responsables del color naranja característico y precursores de la vitamina A, cuyo su papel en relación con la salud es de enorme interés. (Hurtado, Sanchez Mata e Isasa 2001.). Lamentablemente son inestables cuando son expuestos al O_2 o la luz (Shi and Maguer, 2000), cosa que ocurre cuando las células se rompen y los tejidos internos quedan expuestos al ser cortados. Los estudios realizados hasta el momento en cuanto a la retención de carotenoides en zanahoria trozada no son concluyentes (Carlin et al., 1990; Howard y Dewi, 1996; Li and Barth, 1998; Alasalvar et al., 2005).

Los daños producidos en las zanahorias promueven la producción de compuestos fenólicos como los ácidos clorogénico y el hidroxibenzoico (Aubert et al., 1993). Los compuestos fenólicos están relacionados con varios atributos sensoriales (Howard y Griffin, 1993; Talcott y Howard, 1999; Alasalvar et al., 2001) y parecen ser buenos indicadores de capacidad de de las distintas variedades para adecuarse al almacenado en frio como para la transformación industrial en vegetales trozados frescos (Aubert et al., 1993).

La oxidación de los compuestos fenólicos por oxireductasas, un grupo de enzimas que incluyen la peroxidasa y la polifenoloxidasa está relacionada con el pardeamiento de los tejidos cortados (Vermerris y Nicholson, 2006) y la decoloración superficial en zanahorias cortadas (Howard et al., 1994). Además pueden producir metabolitos que provocan el deterioro de los alimentos después del procesamiento. Los compuestos fenólicos también pueden auto-oxidarse por exposición a la luz y al oxígeno (Vermerris y Nicholson, 2006).

Otro indicador importante de la calidad en el post-procesamiento es la actividad de enzimas específicas. La peroxidasa es una enzima clave en el proceso de lignificación en zanahorias y en la oxidación enzimática del caroteno considerada como indicador del estrés oxidativo (Howard y Griffin, 1993; Li y Barth, 1998; Lamikanra y Watson, 2001). La peroxidasas puede también interactuar con los fenoles en reacciones relacionadas con los cambios por deterioro (Barz et al., 1985).

Dentro de los procesos que engloba la preparación de los productos procesados, la etapa de escaldado aparece como una de las más sensibles en cuanto a las pérdidas de calidad tanto organolépticas como nutricionales.

El color de los alimentos se debe a diferentes compuestos, principalmente orgánicos, a pigmentos naturales o colorantes sintéticos añadidos. Cuando son sometidos a tratamientos térmicos, estos pueden alterarse. La mayoría de las frutas y vegetales deben su color a sus correspondientes pigmentos, que son compuestos químicos con una función biológica muy importante en el tejido. Existe una gran cantidad de pigmentos relacionados con las frutas y vegetales, entre ellos las clorofilas, los carotenoides, las antocianinas, los flavonoides, los taninos, las betalaínas, y otros (Badui 1999).

Una buena práctica de escaldado debe asegurar la calidad sensorial de los productos y facilitar su manejo. Esta operación se debe llevar a cabo en forma muy controlada en cuanto a la magnitud del tratamiento térmico en nivel de temperatura y período de aplicación. Además, el tratamiento debe ser detenido en forma rápida mediante un enfriamiento eficiente. Siempre es preferible un tratamiento de alta temperatura por un período corto.

A pesar de ser una operación esencial en el pretratamiento de frutihortícolas, el escaldado con agua presenta serios inconvenientes. Por lado, requiere de un gran consumo de agua y por lo tanto, de un elevado consumo energético. Por otro lado, genera efluentes que contienen una elevada carga microbiana y por lo tanto deben tratarse para reducir la contaminación ambiental.

Durante el proceso se produce pérdida de nutrientes y de propiedades sensoriales. Una alternativa al escaldado convencional mediante agua caliente es el efectuado con microondas. La energía que proporciona el microondas origina la fricción de las moléculas debido a la rápida oscilación en el campo magnético y por consiguiente el calentamiento de las mismas (Giese 1992, IFT 1989, Decareu 1986). Este proceso tiene las ventajas de no generar efluentes y reducir el consumo energético. Sin embargo, deben determinarse cuidadosamente los tiempos de exposición y la potencia a utilizar a fin obtener un producto de buena calidad sensorial y nutricional.

Entre las ventajas del uso de microondas están la rapidez y uniformidad en el tratamiento sin provocar pérdidas de los componentes nutricionales. La conservación del color original mediante este procedimiento ha sido la razón de varios estudios. (Schwartz y Von Elbe 1983, Jiménez et al. 1999). Entre los pigmentos estudiados se reportaron estudios en carotenoides, (Sharon-Raber y Khan 1983, Ott 1992) y la relación entre antocianinas y polifenoloxidasa (Wesche-Ebeling y Montgomery 1990).

Hasta el momento no se han encontrado en la literatura estudios significativos que utilicen esta técnica de escaldado. El objetivo de este estudio fue determinar la efectividad del escaldado por microondas para retardar el deterioro nutritivo y sensorial de zanahorias trozadas, respecto del escaldado tradicional. Para ello se estudiaron la calidad organoléptica (aroma, apariencia), nutricional (β carotenos, fenoles totales),

inactivación de la POD y pérdida de peso de zanahorias trozadas escaldadas con microondas, y se siguió la evolución de dichos parámetros durante su almacenamiento en cámara de refrigeración. Estos resultados, se compararon posteriormente, con los obtenidos mediante escaldado tradicional y los del producto fresco (sin tratamiento).

MATERIALES Y METODOS

Preparación de la muestra

Las zanahorias (*Daucus carota*) fueron adquiridas en un mercado local. Las raíces fueron seleccionadas de acuerdo a la uniformidad de diámetro, descartándose aquellas cónicas y fueron almacenadas en cámara de refrigeración a 4 °C hasta su análisis.

Las zanahorias seleccionadas se cepillaron bajo agua corriente y se sumergieron en baño de agua clorada 200 ppm durante una hora, a fin de disminuir la carga microbiana inicial. Luego fueron peladas manualmente y cortadas en rodajas de un cm de espesor, con una máquina cortadora especialmente diseñada con seis cuchillas, según la siguiente técnica de corte: la zanahoria fue colocada en posición transversal a las cuchillas, dejando fuera de las mismas 5 cm aproximadamente de la corona, y se cortó a partir de allí 6 rodajas de 1 (un) cm del tejido consecutivo a la corona, con el fin de evitar posibles errores en resultados debido a distribución de nutrientes en el tejido. De esta forma se estandariza el muestreo uniformemente, eliminándose corona y cola. Del total de las rodajas obtenidas, se toman al azar aproximadamente 120 gramos de las mismas (alrededor de 17 rodajas). Este número conformará la muestra.

Proceso de escaldado y almacenamiento refrigerado

Antes del escaldado, las zanahorias cortadas fueron previamente descontaminadas por inmersión en agua clorada 50 ppm durante un minuto y posteriormente al mismo, fueron inmediatamente enfriadas bajo agua fría corriente durante tres minutos, a fin de frenar el proceso (Agüero et al, 2008).

Escaldado tradicional por agua caliente

Las muestras fueron sumergidas en agua a ebullición (100°C) durante 30 segundos, (estas condiciones fueron seleccionadas a partir de ensayos previos en los que se buscó obtener un producto visualmente similar al fresco). La relación peso de la muestra / volumen de agua fue 60:4000, de modo que la introducción de las muestras no produzcan una caída significativa en la temperatura del baño.

Escaldado por microondas

Se utilizó un microondas domestico Goldstar modelo ER-686MD con una potencia efectiva de 800 W; 2450MHz. Las rodajas de zanahoria se colocaron en una bandeja plástica de altura previamente definida, en torno a su circunferencia exterior, a fin de garantizar la uniformidad de radiación recibida. El escaldado se realizó manteniendo la masa constante a 400 W durante 1:30´´, condiciones seleccionadas del mismo modo que para el escaldado con agua (Fakhourl, 1992).

Las muestras tratadas por ambas técnicas de escaldado, pesadas en balanza analítica, fotografiadas fueron, antes y después del tratamiento y finalmente almacenadas durante siete días, en cámara con temperatura controlada a 4 °C, en bolsas de polietileno de baja densidad, de 70 micrones de espesor, a fin de garantizar una permeabilidad intermedia al oxigeno, evitando posible deterioro oxidativo por exceso de oxígeno o fermentación por ausencia total del mismo.

Una muestra sin tratar se tomó como control. Las determinaciones físico-químicas y sensoriales de las muestras tratadas y sin tratar, se llevaron a cabo en cuatro estadios de muestreo, a saber: día 0, 3, 5 y 7. Cada experimento se repitió dos veces.

Análisis de la peroxidasa

Extracción

La POD se analizó de acuerdo con el método de Blancas et al. (2002), con algunas modificaciones. Las muestras se procesaron hasta formar un puré. 5 gramos del puré se mezclaron luego con buffer fosfato de potasio frio, 0,1 M pH: 6,5 y se homogeneizó durante un minuto a 11000 RPM. Las suspensiones se filtraron usando una capa de tela de lino para eliminar partículas sólidas. Para eliminar la turbidez del resto de los homogeneizados se centrifugaron a 5000 RPM durante 20 minutos. Los sobrenadantes se filtraron a través de

papel de filtro Whatman N° 2 y se mantuvieron en hielo hasta su análisis. Los extractos enzimáticos se prepararon por duplicado para comprobar la reproducibilidad del total de lecturas iniciales de actividad enzimática de las muestras.

Actividad

La solución sustrato POD se preparó diariamente mediante la mezcla de guayacol 0,1 ml, 0,1 ml de peróxido de hidrógeno (30%) y 99,8 ml de fosfato potásico tampón (0,1 mol/l), pH 6,5. La solución sustrato se homogeneizó, agitando vigorosamente durante unos minutos. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo POD mezclando en tubos de vidrio 0,120 ml de extractos enzimáticos con 3,48 ml de solución sustrato. La actividad POD se midió a partir del aumento de la absorbancia a 470 nm en función del tiempo con un espectrofotómetro (UVPC 2401, Shimadzu Co.). La reacción se controló durante 20 min. Se realizaron dos repeticiones y se consideró su valor promedio para el análisis final.

La actividad enzimática se determinó a partir del cambio de absorbancia por minuto. Para calcular el cambio de absorbancia con tiempo U (ΔAbs/min), solo se tuvieron en cuenta los incrementos iniciales correspondientes a la máxima pendiente de la curva de abs en función del tiempo, y su valor se calculó mediante regresión lineal. La actividad de la enzima se expresó en U/ml extracto enzimático.

Cuantificación de los fenoles totales

Extracción

El extracto metanólico se preparó mediante la adición de 25 ml de metanol a 8 gramos de la muestra puré. Las muestras fueron homogeneizadas mediante un homogeneizador Ultra Turrax-T-25, 8 veces a 16000 rpm, durante un minuto la primera homogeneización, y las restantes durante 20 segundos con intervalos de 2,5 minutos entre una y otra, por un total de 20 minutos, para evitar recalentamiento y pérdida de fenoles. Transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugan durante 15 min a 5000 rpm. Se toman 6 ml de la muestra los cuales son filtrados a través de cartuchos acondicionados de C 18.

Cuantificación

Los Fenoles totales (FT) se determinaron utilizando el reactivo Foline Ciocalteu (FC) de acuerdo con el método de Singelton, Orthofer y Lamuela Raventós (1999), con algunas modificaciones. Se colocaron en tubos de microcentrifuga de 2 ml: 200 µl del extracto fenólico, 200 µl de metanol, 200 µl de MeOH, 200 µl reactivo FC y 1,4 ml de Na_2CO_3. Las muestras se agitaron brevemente e inmediatamente se dejaron reaccionar en la oscuridad durante una hora a temperatura ambiente. Luego, las muestras se centrifugaron en microcentrífuga Biofuge® pico a 13000 rpm durante 3 min. Se leyó la absorbancia de la muestra a 725 nm con solución acuosa de ácido gálico (10- 100 ppm) como estándar. Los resultados se expresaron como mg de equivalente de ácido gálico por 100 g de peso seco de la muestra.

Cuantificación de β carotenos

Los β-Carotenos se analizaron de acuerdo con el método de Biswas, Sahoo, y Chatli (2011), con algunas modificaciones. Las muestras procesadas como puré se conservaron congeladas hasta su análisis, y se descongelaron el día anterior a 4°C en heladera. En todas las etapas las muestras se mantuvieron fuera del alcance de la luz y a baja temperatura. Para la extracción, una porción representativa de esta muestra (1 gramo) fue pesada en un tubo de centrifuga de vidrio recubierto por papel aluminio. Se añadió al mismo 5 ml de acetona fría, y el tubo se homogeneizó 2 minutos a 11000 rpm en baño de agua con hielo, enjuagando luego el omni mixer con 5 ml de acetona para evitar pérdida de muestra. Se agitó ocasionalmente entre muestra y muestra, finalmente se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se recogió en un tubo de ensayo, y el sedimento se re-extrajo con 5 ml de una acetona, seguido por centrifugación de la misma forma que la anterior. La mezcla de ambos de los sobrenadantes fue filtrada con un filtro Whatman N°42. La absorbancia del extracto fue determinada a 449 nm en espectrofotómetro UV visible. Los resultados se expresaron como µg de beta caroteno por g de peso fresco de la muestra.

Materia Seca (%)

Se determinó por pesaje de la muestra que se ha secado en estufa a 60 °C hasta peso constante (48 horas):

$$MS\ (\%) = \frac{(\text{Peso cápsula} + \text{Peso seca}) - \text{Peso cápsula}}{(\text{Peso cápsula} + \text{Peso fresco}) - \text{Peso cápsula}} * 100$$

Pérdida de peso (%)

Las rodajas de las muestras tratadas y sin tratar fueron pesadas antes del escaldado, después del mismo (en aquellas tratadas), y en cada día de análisis, en balanza analítica, para determinar su pérdida de peso en liquido debida al escaldado y al tiempo de almacenamiento, expresado en porcentaje.

Aspecto visual

Se construyó una tabla en la que se tuvo en cuenta: aspecto de las rodajas respecto de la muestra fresca, color, olor típico, exudado de líquido externo e interno, firmeza ante el corte con cuchilla, pegajosidad superficial. Para esto, se tomaron fotos de las muestras tratadas y sin tratar, antes del escaldado, después del mismo (en aquellas tratadas) y en su correspondiente día de análisis.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa estadístico infoStat, versión actualizada al 2012. Se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA, dos repeticiones), con el test de comparaciones de tukey y un nivel se significación $\alpha = 0{,}01$, para evaluar el efecto del tiempo-temperatura/potencia de escaldado sobre la actividad peroxidasa, contenido de fenoles totales, y beta carotenos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra actividad de la POD en función del tiempo de almacenamiento normalizadas con el valor de la POD inicial (antes del tratamiento) para todos los casos evaluados. Se puede observar que ambos tratamientos conducen valores de inactivación similares. Estos valores se mantuvieron durante el constantes durante el almacenamiento en cámara.

La muestra sin escaldar, por el contrario, muestra un aumento de la actividad con el tiempo de almacenamiento concordante con los daños sufridos por el material biológico y los cambios deteriorativos en el color, (Howard et al., 1994

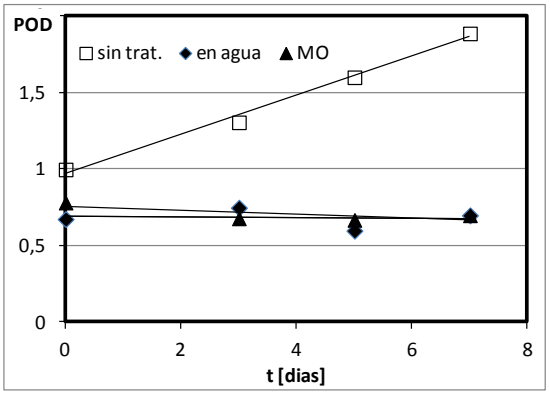


Figura 1. Efecto de la Actividad de la POD con el almacenamiento en muestras sin tratar, y escaldadas en agua y MO.

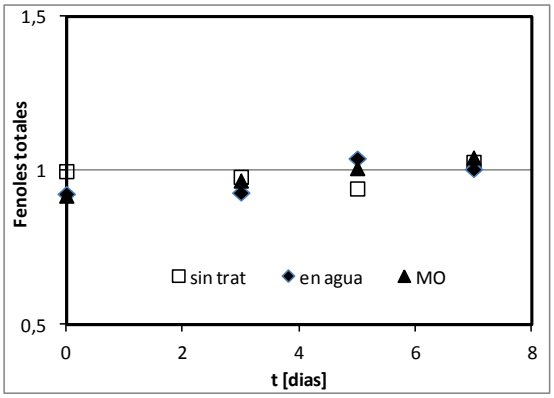


Figura 2. Efecto del contenido de fenoles totales con el almacenamiento en muestras sin tratar, y escaldadas en agua y MO.

La figura 2 presenta los resultados del contenido de fenoles totales normalizados con el valor inicial de las muestras sin tratar. Tal como se puede comprobar, no se encontraron variaciones significativas en el contenido de fenoles entre las muestras escaldadas mediante ambas técnicas y las correspondientes muestras sin escaldar, (Fig. 2). ($p \leq 0{,}01$) y su valor se mantuvo constante durante todo el período de almacenamiento. Estos resultados no concuerdan con lo esperado de acuerdo a lo reportado en la literatura que indican que el contenido de compuestos fenólicos aumentaría con el daño producido (Aubert et al., 1993, Reyes et al., 2007). Sin embargo otros autores ya han encontrado resultados similares o en los que se observa un descenso en contenido de los mismos (Milza Moreira et al., 2011, Rocha et al., 2007). Reyes et al. (2007) reportaron que los cambios en el contenido de fenoles en respuesta al daño podía variara desde una disminución del 26 % a un aumento del 191 %, dependiendo del tipo de tejido del vegetal o fruta considerado. A pesar de indicar un aumento del contenido de fenoles para zanahorias cortadas, no se sabe si este cambio difiere entre distintos cultivares o el grado de madurez en el momento de la cosecha.

Tanto para las muestras escaldadas por ambas técnicas como sus correspondientes muestras sin tratar, no se registraron diferencias significativas en el contenido de carotenos, ya sea en su análisis inicial como durante el almacenamiento (Figura 3). ($p \leq 0{,}01$). Según esto, los niveles de carotenoides en zanahorias peladas y pre-

cortadas, con y sin tratamiento de escaldado se verían afectados durante el almacenamiento. Resultados similares fueron obtenidos por Chen et al., 1996, en zanahoria fresca trozada y Carrasco y Cisneros Zevallos, 2002, en zanahorias en rodajas frescas y escaldadas.

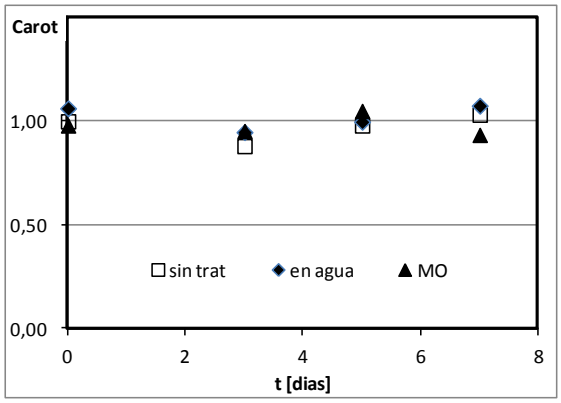


Figura 3. Efecto de la retención de β carotenos (normalizado con su valor inicial) con el almacenamiento de muestras sin tratar y escaldadas en agua y MO.

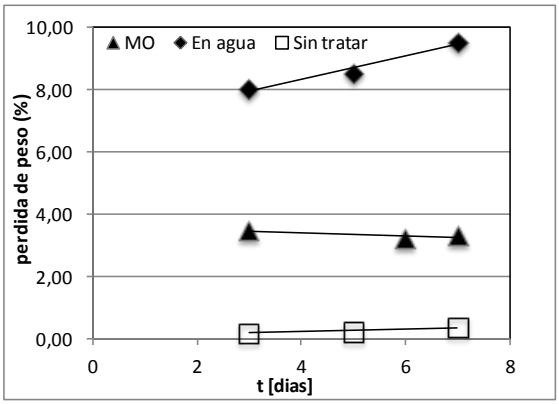


Figura 4. Pérdida de peso por almacenamiento de rodajas de zanahorias sin tratar y escaldadas por agua y MO.

En la Figura 4 se puede ver que las muestras sin tratar, sufrieron un bajo porcentaje de pérdida de peso que se mantuvo contante durante los días de almacenamiento. Este efecto se visualiza con el aspecto reseco sobre la superficie de las rodajas. (Tabla 1).

Las muestras escaldadas por el método tradicional en agua caliente, tuvieron una pérdida de peso considerable, que fue directamente proporcional a los días de almacenamiento. Este efecto pudo corroborarse con el exudado de líquido sobre la superficie de las rodajas. (Tabla 1). Las muestras escaldadas mediante microondas, presentaron una pérdida de peso intermedia entre las muestras sin tratar y las escaldadas por agua caliente. Estos valores se mantuvieron constantes durante los días de almacenamiento.

La Tabla 1 exhibe los resultados de la observación visual realizada en las rodajas de zanahoria antes, después de los tratamientos de escaldado y durante el almacenamiento en cámara a 4°C. Se puede destacar que, con respecto al producto fresco, las muestras sin tratar mostraron un aspecto reseco, lignificado, y ausencia de aroma y color característico que se fue acentuando con los días de almacenamiento. Por su parte, las muestras tratadas por el método tradicional mostraron un color naranja intenso, manteniendo el aroma típico durante los días de almacenamiento. Sin embargo se observó una disminución de la firmeza de dichas muestras, junto a un gran exudado de líquido en superficie, similar al producto cocido, es decir, un aspecto no deseado,. Estos últimos efectos no se observaron en las muestras escaldadas mediante MO, las cuales mostraron una apariencia óptima, similar al producto fresco en cuanto aroma, color, firmeza y aspecto general.

Los resultados en la decoloración observada en el producto sin tratamiento indicarían que el cambio de color de naranja intenso a pálido observado durante almacenamiento de las rodajas sin tratar no se debería a cambios en el contenido de carotenoides. Sin embargo, no se puede descartar que se puedan producir oxidación de los carotenoides en forma localizada al nivel de la superficie, lo cual podría explicar los cambios de color observados. Sin embargo, por su aspecto, en las muestras no escaldadas, el cambio en la intensidad del color naranja que se observa podría estar asociado a los cambios fisiológicos como la formación de lignina.

Tabla 1. Evaluación subjetiva de aspectos de calidad en las zanahorias sin tratamiento y escaldadas por ambos métodos durante el almacenamiento a 4°C.

Dia	Aspecto evaluados	Sin trat.	Escaldado en agua	Escaldado con MO
0	Aspecto general	Típico, fresco	cocido	Similar al fresco, no cocido
	Color	Naranja	Naranja intenso	Naranja intenso
	Aroma	típico	típico	Típico
	Textura (corte con cuchillas)	Firme, típico fresco	firme	Firme
	Exudado	-	-	-
3	Aspecto general	Algo lignificado y reseco	Cocido	Similar, no cocido
	Color	Naranja blanquecino	Naranja intenso	Naranja intenso
	Aroma	Típico, menos intenso	típico	Típico
	Textura (corte con cuchillas)	Firme	Firme. Menos que el testigo almacenado. Aureola blanca alrededor del centro	Firme. Tejido no contraído, uniforme
	Exudado	Bajo	Alto	Medio
5	Aspecto general	Lignificado, reseco, agrietado	Cocido	Algo cocido
	Color (respecto al fresco)	Naranja pálido blanquecino	Naranja intenso	Naranja intenso
	Aroma (respecto al fresco)	típico	típico	Típico
	Textura (prueba de corte con cuchillas)	Firme, tejido algo contraído	Firme. Disminución en superficie	Más firme que agua.
	Exudado	Bajo	Alto	Medio
7	Aspecto general	Lignificado, muy reseco, agrietado	Muy cocido	Algo cocido
	Color	Naranja blanquecino, pálido	Naranja muy fuerte	Naranja fuerte, brillante
	Aroma	Sin olor	típico	Típico
	Textura (corte con cuchillas)	Firme. Exuda líquido en el interior. Tejido contraído	Ídem día 5. No libera líquido en el interior. Tejido uniforme, no contraído	Ídem día 5. No libera líquido en el interior. Tejido uniforme.
	Exudado	Bajo	Alto	Medio

CONCLUSIONES

Las zanahorias peladas y cortadas constituyen un producto interesante debido a su aporte en pigmentos antioxidantes, y nutrientes y si bien su consumo es recomendable, su estabilidad sensorial, sin embargo es limitada. En este trabajo se demostró que ambas técnicas de escaldado inactivan eficazmente la enzima por igual. Ambas técnicas de escaldado en rodajas de zanahorias mostraron un incremento en la intensidad del color, en comparación con el testigo, debido a la inhibición parcial de la enzima oxidante. Sin embargo, las muestras escaldadas por MO presentan mayor similitud al producto fresco en cuanto a firmeza, aspecto, exudado, aroma y color, resultando por dichos motivos el método de escaldado más favorable. Además no se observaron cambios significativos en los contenidos de fenoles totales y β- carotenos tanto después del tratamiento como durante el almacenamiento. Sin embargo este trabajo debería complementarse analizando

otras combinaciones posibles de potencia y tiempo de tratamiento y con un estudio microbiológico para asegurar su vialidad.

BIBLIOGRAFÍA

Aguero M.V., Ansorena, M. R., Roura, S. I., Del Valle, C. E. 2008. Thermal inactivation of peroxidase during blanching of butternut squash. Science direct, LWT 41, 401–407.

Alasalvar, C.; Grigor, J. M.; Zhang, D.; Quantick, P. C.; Shahidi, F., 2001. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v. 49, n. 3, p. 1410-1416.

Alasalvar, C.; Al-Farsi, M.; Quantick, P. C.; Shahidi, F.; WiktorowicZ, R., 2005. Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots. Food Chemistry, London, v. 89, n. 1., p. 69-76.

Aubert, S.; Babic, I.; Amiot, M.; Nguyen-The, C. , 1993. Les composés phénoliques marqueurs de la qualité de carottes conservées au froid. Acta Horticulturae, Leuven, v. 354, n. 1, p. 201-214.

Badui D.S. 1999. Química de los alimentos, Addison Wesley y Logman de México.

Barz, W.; KOster, J.; Weltring, K. M.; Strack, D. Recent advances in the metabolism and degradation of phenolic compounds in plants and animals. In: Sumere, C. F.; Lea, P. J. The Biochemistry of Plant Phenolics. Oxford: Claredon Press, 1985. p. 307-347.

Biswas A.K., Sahoo J., Chatli M.K. 2011. A simple UV-Vis spectrophotometric method for determination of b-carotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meat nuggets, LWT - Food Science and Technology 1-5.

Burnette, F.S. 1977. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. Journal of Food Science, 42(1), 1–6.

Carlin, F.; NGuyen-The, C.; Hilbert, G.; Chambroy, Y. , 1990. Modified atmosphere packaging of fresh, "ready-to-use" grated carrots in polymeric films. Journal of Food Science, Chicago, v. 55, n. 4, p. 1033-1038.

Chen, G.; Djuric, Z., 2001. Carotenoids are degraded by free radicals but do not affect lipid peroxidation in unilamellar liposomes under different oxygen tensions. FEBS Letters, Amsterdam, v. 505, n. 1, p. 151-154.

Decareau, V.R. 1986. Microwave food processing equipment throughout the world, Food Techn.

Fakhouri M.O. 1992. Microwave blanching and reheating of foods. Departmcnt of Food Science and Agricultural Chemistry McGill University, Montreal, Canada.

Giese, J. 1992. Advances in microwave food processing, Food Technology, 118-123.

Gonçalves E.M, Pinheiro J., Abreu M., Brandao T.R.S.,. Silva C.L.M. Journal of Food Engineering 97 (2010) 574–581.

Heinonen, I.M. 2002. Antioxidants in fruits, berries and vegetables. In: Jongen, W. (Ed.), Fruit and Vegetable Processing, Improving Quality. Woodhead Publishing Limited, pp. 23–51.

Howard, L. R.; Griffin, L. E. , 1993. Lignin formation and surface discoloration of minimally processed carrot slices. Journal of Food Science, Chicago, v. 58, n. 5, p. 1065-1067.

Howard, L. R.; Griffin, L. E.; Dewi, T., 1994. Steam treatment of minimall processed carrot sticks to control surface discoloration. Journal of Food Science, Chicago, v. 59, n. 2, p. 356-370.

Howard, L. R., Dewi, T. ,1996. Minimal processing and edible coating effects on composition and sensory quality of minipeeled carrots. Journal of Food Science, Chicago, v. 61, n. 3, p. 643-651.

Hurtado, Sanchez Mata e Isasa. 2001. Frutas y verduras: fuente de salud. Nutrición y salud. Instituto de Salud Pública, Madrid.

Ift. 1989. Microwave Food Processing, Food Technology, 117-126.

Jiménez, M.E., Zambrano, M.L., Dorantes, L., Aguilar, M.R. 1998. Efecto del tratamiento térmico por microondas del puré de aguacate sobre la extracción del aceite de aguacate, Información Tecnológica, 10 (4), 115-118.

Lamikanra, O.; Watson, M. A., 2001. Effects of ascorbic acid on peroxidase and polyphenoloxidase activities in fresh-cut cantaloupe melon. Journal of Food Science, Chicago, v. 66, n. 9, p. 1283-1286.

Li, P.; Barth, M. M., 1998. Impact of edible coatings on nutritional and physiological changes in lightly-processed carrots. Postharvest Biology and Technology, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 51-60.

Lindley, M. G., 1998. The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. Trends in Food Science & Technology, Guildford, v. 9, n. 8-9, p. 336-340.

Morales-Blancas, E. Chandia, F., Cisneros-Zevallos, L. 2002. Thermal inactivation kinetics of peroxidase and lipoxygenase frım broccoli, green asparagus and carrots. Journal of Food Science, 67, 146–154.
Ott, D.B. 1992. Experimento: pigmentos vegetales. Manual de laboratorio de ciencias de los alimentos, Acribia, España.
Reyes, L. F.; Villarreal, J. E.; CisneroS-Zevallos, L., 2007. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. Food Chemistry, London, v. 101, n. 3, p. 1254-1262.
Rocha, A. M. C. N.; Ferreira, J. F. F. C.; Silva, A. M. M., Almeida, G. N.; Morais, A. M. M. B., 2007. Quality of grated carrot (var. Nantes) packed under vacuum. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, v. 87, n. 3, p. 447-451.
Schwartz, S.J., Von Elbe J.H. 1983. Kinetics of chlorophyll degradation to pyropheophytin in vegetables, J. Food Science, 48(1), 1303-1306.
Sharon-Raben, O., Kahn, V. 1983. Avocado mesocarp; browing potential, carotenoid content, polyphenoloxidase, catalase and peroxydase activities: comparison between six avocado cultivars, J Food Science 48 (1), 1874-1875.
Shi, J.; Maguer, M. L., 2000. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. Critical Reviews in Biotechnology, Boca Raton, v. 20, n. 4, p. 293-334.
Singelton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Foline Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, 299, 152-178.
Talcott, S. T.; Howard, L. R., 1999. Chemical and Sensory Quality of Processed Carrot Puree As Influenced by Stress-Induced Phenolic Compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v. 47, n. 4, p. 1362-1366.
Vermerris, W.; Nicholson, R. Phenolic compound biochemistry. Dordrecht: Springer, 2006. 276 p
Wesche-Ebeling, P., Montgomery, W.M. 1990. Straw-berry polyphenoloxidase: its role in Anthocyanin degradation, *J.* Food Science, 55(3), 731-734, 745.

Propiedades térmicas y estructurales de películas compuestas de poli (vinil alcohol) y carboximetilcelulosa

Villarruel S. Rivero[1] S. y Pinotti[1,2] A.

1. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), CONICET, Facultad Ciencias Exactas,
2. Facultad Ingeniería, UNLP, La Plata, ARGENTINA.
sandra_gmr@yahoo.com

Resumen: Los objetivos propuestos fueron: evaluar las propiedades térmicas de las películas desarrolladas a base de poli vinil alcohol (PVA) y carboximetilcelulosa (CMC), identificar los grupos funcionales involucrados en las interacciones de la matriz polimérica.
A partir de los espectros dinámico mecánicos de las películas de PVA y CMC se visualizó en las curvas de tan δ la temperatura de transición vítrea (T_g) localizada a 65ºC y a 142ºC, respectivamente valores que correlacionaron con los obtenidos por calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC).
Por espectroscopía de infrarrojo se identificaron las bandas características de cada polímero. El espectro resultante de las películas compuestas de PVA y CMC mostró una combinación de los espectros individuales. Los desplazamientos y la aparición de nuevos picos confirmaron las interacciones establecidas entre la CMC y el PVA a través de puentes de hidrógeno Por microscopía electrónica de barrido (SEM) se evidenció una estructura del tipo globular, lo que permite explicar los cambios en las propiedades del material. Se demostró la factibilidad de la CMC para formar películas de un solo componente y sistemas combinados con PVA. Se comprobó que el agregado de PVA en la formulación mejoró propiedades de barrera al vapor de agua sin detrimento de las propiedades mecánicas.

Palabras claves: Películas biodegradables, propiedades térmicas, propiedades mecánicas.

Abstract: The objectives were: to evaluate the thermal properties of the films based on poly vinyl alcohol (PVA) and carboxymethyl cellulose (CMC) and to identify the functional groups involved in the interactions of the polymer matrix.
From dynamic mechanical spectra of PVA films, the glass transition temperature (T_g) located at 37°C was visualized in tan δ curves, while CMC films presented a T_g at about 142°C. These values correlated with those obtained by Modulated differential scanning calorimetry (MDSC).
From infrared spectroscopy bands were identified the characteristics of each polymer. Moreover, the films composed of PVA and CMC resulting spectrum showed a combination of the individual. The displacements and the appearance of new peaks confirmed the interactions established between the CMC and the PVA through hydrogen bridges scanning electron microscopy (SEM) shows a globular type structure, allowing to explain the changes in material properties. The feasibility of the CMC to form a single component films and combined with PVA. It was found that addition of PVA in the formulation improved barrier properties to water vapor without detriment of the mechanical properties.

INTRODUCCIÓN

La modificación de polímeros sintéticos empleando otros polímeros de origen natural es una vía para la obtención de materiales biocompatibles y/o biodegradables. El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero hidrosoluble que puede ser utilizado como base para la realización de mezclas con otros polímeros. El PVA es sintético, con una estructura semicristalina, obtenido mediante hidrólisis del acetato de polivinilo (Kubo y Kadla, 2003). A pesar de su origen sintético es un polímero no tóxico, biodegradable y biocompatible, por lo que ha sido utilizado en las industrias químicas, de envases y en las áreas farmacéutica y médica.
La carboximetilcelulosa (CMC) es un derivado de la celulosa con propiedades filmogénicas, utilizada en el área de alimentos. La combinación de ambos polímeros para producir películas biodegradables permite obtener materiales con propiedades con posibles aplicaciones en el desarrollo de envases (Dalla-Vecchia *et al.* 2005).
Los objetivos propuestos fueron: evaluar las propiedades térmicas de las películas desarrolladas a base de poli vinil alcohol (PVA) y carboximetilcelulosa (CMC), identificar los grupos funcionales involucrados en las interacciones de la matriz polimérica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Se utilizó poli vinil alcohol (ELVANOL T25) proporcionado por DuPont, y carboximetilcelulosa, sódica (Parafarm).

Preparación de las películas

Las soluciones de PVA al 2% (p/p) se prepararon por solubilización en agua a 80ºC durante 40 min. La soluciones de CMC al 1.5% (p/p) se prepararon por solubilización en agua y mediante agitación durante 24 horas. Todas las películas se prepararon mediante la técnica de moldeo de 20 g de la solución formadora de películas en placas de acrílico; las cuales se secaron en estufa a 37°C. A partir de estas soluciones formadoras de películas se prepararon mezclas de CMC y PVA con las siguientes proporciones CMC:PVA: 25:75, 50:50, 75:25 (p/p).

Espesor de las películas

Las medidas de los espesores de las muestras se realizaron utilizando un medidor electrónico CheckLine 900 (EE.UU) para materiales no conductores y sustratos no ferrosos. Los valores informados fueron el promedio de al menos 10 medidas.

Contenido de humedad

La pérdida de peso de las películas se determinó midiendo el peso a tiempo inicial y luego de ser secadas en estufa a 105°C hasta peso constante. Las muestras se analizaron por triplicado, y los resultados obtenidos fueron expresados en porcentaje (g agua / 100 g película).

Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La permeabilidad al vapor de agua, se determinó según una modificación del método de la ASTM E96 (Rivero *et al*. 2009). Las películas se colocaron en celdas de acrílico, y las mismas fueron depositadas en recipientes herméticos. Las muestras se sometieron a un gradiente de humedad relativa, colocando sílica gel anhidra en la celda (0% RH), y una solución saturada de NaCl en el recipiente (75% RH). Este gradiente corresponde a una fuerza impulsora de 1753.55 Pa, expresada como presión parcial de vapor de agua a 20°C. Se registró el cambio en el peso de la celda en una balanza analítica y ésta se graficó en función del tiempo (h). Los datos se regresionaron linealmente, se calculó la permeabilidad al vapor de agua (PVA) en g Pa^{-1} s^{-1} m^{-1} de las películas desarrolladas considerando el espesor de las mismas.

Propiedades mecánicas

La resistencia a la tracción (MPa), la elongación porcentual (%) y el módulo elástico se determinaron en un texturómetro TA.XT2i – Stable Micro Systems (Inglaterra) mediante ensayos con un sistema de pinzas de tensión A/TG según la norma ASTM D882-91 (1996). Para los ensayos se utilizaron películas de 6 cm de longitud y 0.7 cm de ancho. Las curvas de fuerza (N) en función de la deformación (mm) fueron registradas por el software Texture Expert Exceed instalado en una PC conectada al equipo.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los estudios de la morfología de las películas se realizaron por microscopía electrónica de barrido con un SEM FEI QUANTA 200 (Japón). Para las observaciones de secciones transversales las películas fueron criofracturadas por inmersión en nitrógeno líquido. Las muestras se montaron en tacos de bronce con una cinta bifaz, permitiendo así la visualización de las superficies y de las secciones transversales. Además, las observaciones SEM también permitieron evaluar el espesor de las películas.

Difracción de rayos X

Los patrones de difracción de rayos X de las películas se obtuvieron usando un equipo X'Pert Pro P Analytical Model PW 3040/60 (Holanda), utilizando la línea Cu Kα (1.542 Å), con una diferencia de potencial de 40 kV y una densidad de corriente de 30mA. Las muestras se registraron entre 3–60º grados (2θ). Para efectuar el análisis las muestras fueron acondicionadas a 20ºC y 55% HR.

Propiedades térmicas de las películas (MDSC)

Las propiedades térmicas de las películas formuladas con PVA, CMC y sus mezclas fueron determinadas usando un calorímetro diferencial de barrido modulado (DMSC) modelo Q100 de (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA).

Muestras de aproximadamente 6-5 mg se pesaron en cápsulas de aluminio selladas herméticamente, utilizando una cápsula vacía como referencia. Los análisis de DSC se realizaron a una velocidad de calentamiento de 10 ºC min^{-1} en un intervalo de temperaturas de -100 a 250 ºC. Luego de que el primer barrido fue completado, la muestra se enfrió hasta -100 ºC y se registró una segunda corrida sobre la misma muestra.

Se efectuaron dos barridos en simultáneo. Los parámetros vinculados al proceso se determinaron con el software Universal Analysis V1.7F (TA Instruments).

Análisis dinámico mecánico (DMA)

Los ensayos fueron realizados en un equipo de análisis dinámico-mecánico térmico Q800 (TA Instruments, New Castle, EE.UU) usando pinzas de tensión con un sistema de enfriamiento con N_2 líquido. Las películas se cortaron con una geometría rectangular (30 mm de largo, 6 mm de ancho y espesores entre 50 y 70 □m). El barrido de amplitud se realizó a una frecuencia fija de 5 Hz con el objeto de determinar el rango de viscoelasticidad lineal de la muestra y seleccionar la amplitud de trabajo. Se llevaron a cabo ensayos de barrido de frecuencias a 1, 3, 5, 10 y 15 Hz dentro del rango de viscoelasticidad lineal. La temperatura varió entre -90 a 200°C a una velocidad de calentamiento de 5°C/min.

Las curvas del módulo de almacenamiento (E´), el módulo de pérdida (E") y la tan δ (E"/E´) en función de la temperatura fueron registradas y analizadas utilizando el software Universal Análisis 2000. Se determinaron las temperaturas de los procesos de relajación asociadas a la transición vítrea del material a través del pico máximo alcanzado en las curvas de la tan δ y del módulo E", y el punto de inflexión en la curva del módulo E´.

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados obtenidos se empleó el test de comparación de medias de Fisher (LSD) y de análisis de varianza (ANOVA), utilizando el paquete estadístico Systat (versión 10, USA), con un nivel de significación de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica de las películas

Las películas de un solo componente (PVA o CMC) y sus mezclas fueron transparentes y de apariencia uniforme. Las mismas fueron fácilmente removidas de las placas de acrílico en todas las concentraciones ensayadas, y el espesor promedio de las mismas se encontró en el rango de 50 a 70 μm.

Los valores de permeabilidad al vapor de agua (WVP) y de humedad de las películas obtenidas se muestran en la **Tabla 1**. Los valores de WVP para las películas de CMC y PVA fueron de 7,68 y 1,46 × 10^{11} g s^{-1} m^{-1} Pa^{-1}, respectivamente. Se observa una mejora de las propiedades de barrera con el agregado de PVA en las mezclas. Asimismo, las películas de CMC y las películas mezclas con mayos proporción de CMC presentan mayores valores de humedad esto puede atribuirse a las propiedades hidrofílicas del polímero.

Tabla 1 Contenido de humedad y propiedades de barrera al vapor de agua de películas compuestas por CMC y PVA*.

	Contenido de humedad (g/100 g de películas)	**WVP g x 10^{11} g s^{-1} m^{-1} Pa^{-1}**
CMC	24,06 (0,54)	7,68 (0,93)
75-25	19,05 (0,07)	3,63 (0,24)
50-50	16,08 (0,56)	2,07 (1,32)
25-75	17,05 (0,86)	1,59 (0,54)
PVA	9,18 (0,51)	1,46 (0,51)

* Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar.

Propiedades mecánicas

La **Figura 1a y b** muestra los parámetros obtenidos de los perfiles mecánicos de los materiales desarrollados. Las películas de CMC presentan un comportamiento de un material rígido y quebradizo, mientras que el PVA un patrón correspondiente a una matriz flexible.

Las mezclas no presentan un comportamiento que refleje el aporte ponderado de sus componentes. Las películas compuestas 50-50 y 75-25 reproducen el comportamiento de la CMC con ligeras diferencias en la elongación para la mezcla 50-50. Mientras que sólo la formulación 25-75 evidenció un patrón mecánico similar al del PVA.

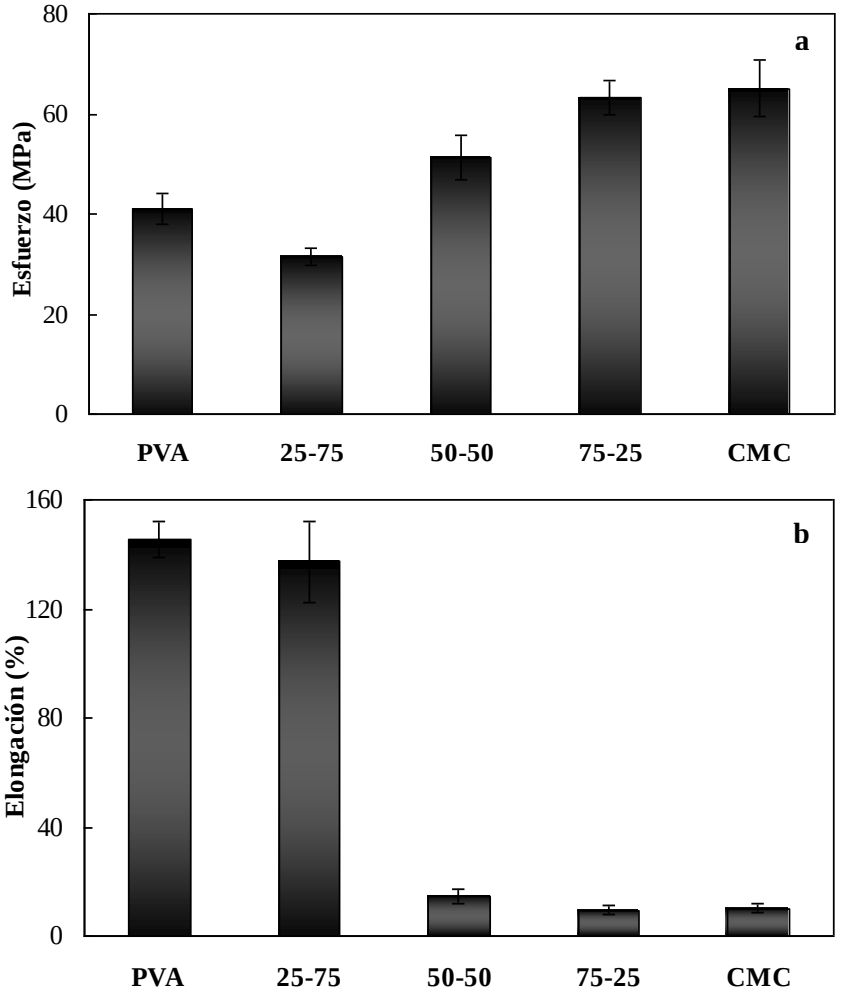


Figura 1: Propiedades mecánicas de películas a base de CMC y PVA y sus mezclas en distintas proporciones.

Análisis por microscopía electrónica de barrido

Llamamos morfología a la forma constituida por las dos fases y al arreglo de las fases. Controlando las cantidades relativas de los polímeros es posible afectar la morfología de una mezcla inmiscible. Como se muestra en la **Figura 2** las películas de un solo componente evidencian una estructura homogénea, compacta, sin poros, en tanto la morfología de muestras compuestas analizadas por SEM es principalmente globular.

En la micrografía de la mezcla 25:75 es posible observar al componente minoritario, CMC, inmerso en una fase continua de PVA. En el caso del sistema compuesto 75:25 se tiene el arreglo contrario, es decir una fase discontinua de PVA en la fase mayoritaria de CMC. Cuando las cantidades de una y otra son iguales, es decir en la mezcla 50:50 los dominios de ambos polímeros son co-continuos.

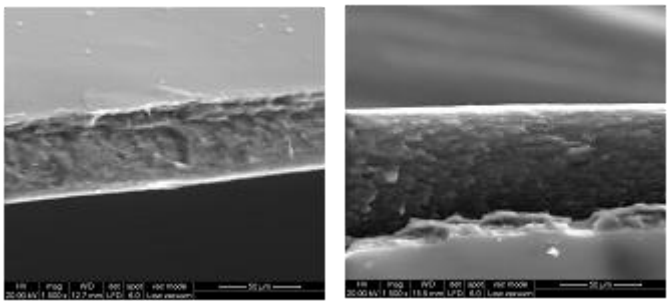


Figura 2: SEM de corte transversal de películas a base de CMC y PVA y sus mezclas en distintas proporciones.

Propiedades térmicas y espectroscópicas

La **Figura 3** muestra la dependencia de la tan δ con la temperatura para las películas de PVA, CMC y sus mezclas.

La relajación β, característico del movimiento local de los segmentos de las cadenas poliméricas o asociado a los movimientos de las moléculas de agua en los materiales, se localizó alrededor de -25ºC para la CMC y la mezcla 75:25. Sin embargo no fue visible para el PVA y las mezclas 50:50 y 25:75.

El segundo pico observado en las curvas de tan δ de los espectros de las películas de CMC y PVA corresponde a la relajación α, la que se asocia a la transición vítrea dinámica (T_g). Los espectros dinámico mecánicos de las películas de PVA y de CMC evidenciaron la T_g localizada a 37ºC y 142ºC, respectivamente. Este evento es independiente de la frecuencia ensayada y refleja la movilidad de los segmentos de las cadenas largas en los dominios amorfos del polímero (Lazaridou y Biliaderis, 2002).

En el caso de las mezclas, se observa un comportamiento típico de ***sistemas binarios inmiscibles***, donde se observa la contribución de cada componente individual de la mezcla en los fenómenos de relajación. Similares resultados fueron informados por Sarli y Scandola (1995) para películas compuestas por colágeno y poli vinil alcohol.

A través del análisis de las curvas de flujo de calor reversible obtenidas por MDSC se pudo observar nuevamente el comportamiento típico de un sistema binario inmiscible evidenciado por la aparición de dos temperaturas de transición vítrea cada una correspondientes a los polímeros empleados para la formulación de las mezclas.

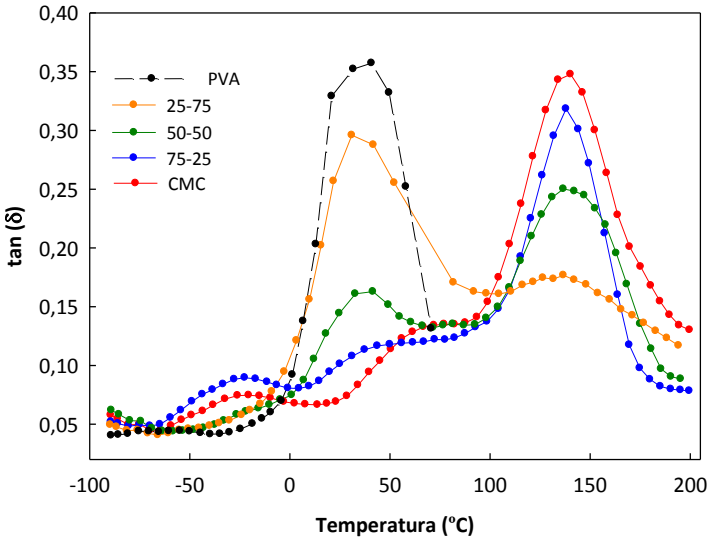


Figura 3: Espectro dinámico mecánico de películas de CMC y PVA y sus mezclas en distintas proporciones.

Se analizaron los espectros obtenidos por difracción de rayos X de las películas, dado que el conocimiento de la microestructura del material es crítico y determina sus propiedades mecánicas y de barrera.

El patrón de difracción de rayos X de la película de PVA muestra un pico difuso localizado a 2□□= 11º (**Figura 4**) y un pico bien definido a 2□= 20º lo que indicó la presencia de una estructura semicristalina típica del polímero, consistente con estudios preliminares realizados por Bhadra y Sarkar (2010).
En el caso de las películas de CMC el patrón de difracción presentó un solo pico muy ancho a 21º. Las películas compuestas evidenciaron un comportamiento intermedio entre ambos polímeros. La mezcla 75:25 presentó aún un pico muy poco definido a 11º y otro definido a 20º. Las mezclas con cantidades crecientes de CMC sólo permiten visualizar el pico a 20º, con una intensidad creciente a medida que aumenta la proporción de PVA. Este hecho podría ser explicado teniendo en cuenta cierto grado de ordenamiento de las moléculas involucradas en las interacciones entre polímeros. Estos resultados explican las diferencias encontradas en las propiedades de barrera al vapor de agua de las películas. Las mezclas entre los polímeros pueden inducir la formación uniones puente hidrógeno inter e intramoleculares dando lugar a la formación de una estructura con un ordenamiento diferente que modifique las propiedades de los materiales.

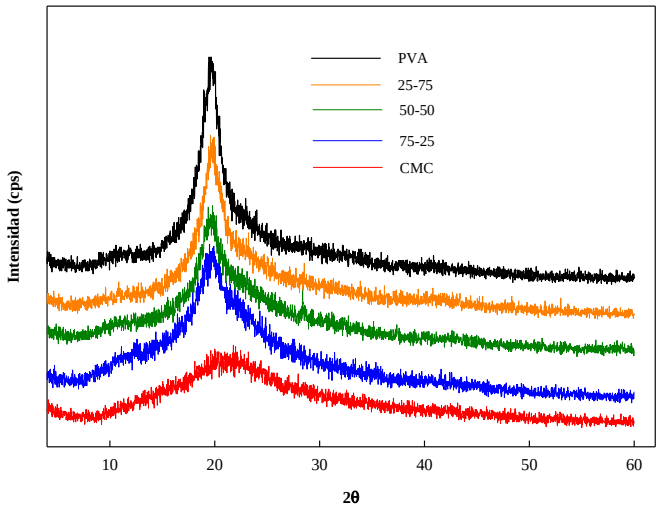


Figura 4: Espectros de difracción de rayos X de películas de PVA y CMC y sus mezclas en distintas proporciones.

Análisis por FTIR
La **Figura 5** muestra los espectros de FTIR de películas de PVA y CMC y sus mezclas.

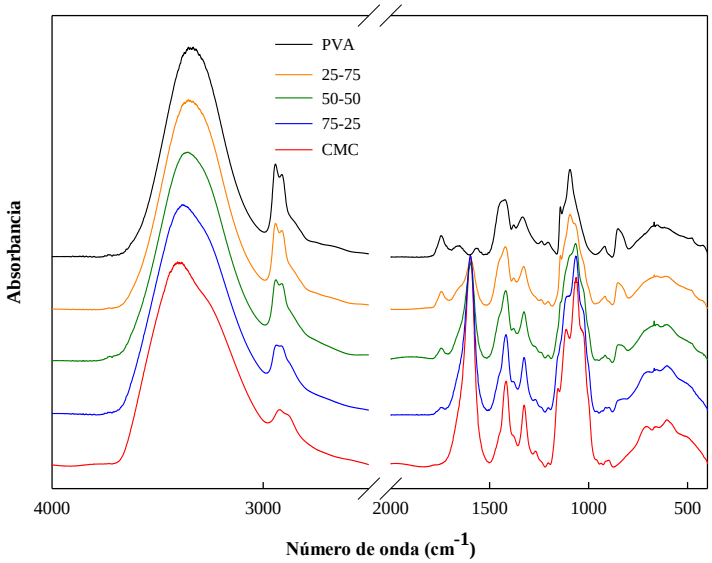


Figura 5: Espectros de FTIR de películas de PVA y CMC y sus mezclas en distintas proporciones.

En el caso de los de las películas de PVA los espectros evidenciaron una banda localizada en la región de 3500-3000 cm^{-1} debida la vibración del estiramiento -OH de las moléculas de alcohol y agua, mientras los picos a 2943 y 2911 cm^{-1} correspondieron a los grupos CH y CH_2 (Labidi y Djebaili, 2008). Además, la banda a 1713 cm^{-1} asociada con las vibraciones del estiramiento del C=O de los grupos acetato se correlacionaron con el hombro a 1270 cm^{-1}, que está de acuerdo con un alcohol polivinílico parcialmente hidrolizado.

En las películas de CMC se visualizó una banda debida a los -OH en la región de 3500 cm^{-1}, un pico a 2927 cm^{-1} correspondiente a la vibración del estiramiento CH y a 1064 cm^{-1} (unión -COC) debido el estiramiento asimétrico de la banda de éter.

La desprotonación de los grupos carboxilo se puede comprobar por la ausencia del estiramiento del carbonilo a 1732 cm^{-1} y la presencia tanto del pico a 1583 cm^{-1} debido al estiramiento asimétrico de la unión -COO- como del pico a 1418 cm^{-1} correspondiente al estiramiento simétrico del mismo (Cuba-Chiem *et al.* 2008). La banda observada a 1110 cm^{-1} es atribuida a las vibraciones de las uniones C(5)-C(6) y C(6)-O(6) mientras la banda a 1153 cm^{-1} se debe a una combinación de la CO-y-CC-COH con estiramiento y flexión -CCH.

El espectro resultante de las películas compuestas de PVA y CMC mostró una combinación de los espectros individuales. Los desplazamientos y la aparición de nuevos picos confirmaron las interacciones establecidas entre la CMC y el PVA a través de puentes de hidrógeno (Taleb *et al.* 2009).

CONCLUSIONES

Se demostró la factibilidad de la CMC para formar películas de un solo componente y sistemas combinados con PVA. Se comprobó que el agregado de PVA en la formulación mejoró propiedades de barrera al vapor de agua sin detrimento de las propiedades mecánicas. Asimismo, los espectros dinámico mecánicos permitieron visualizar el comportamiento de los componentes de la mezcla. Los espectros de difracción de rayos X, la microscopía electrónica de barrido y los espectros obtenidos por FTIR evidenciaron los cambios ocurridos a nivel estructural que permitieron explicar las modificaciones en las propiedades de los materiales.

BIBLIOGRAFÍA

Bhadra J, Y Sarkar D. 2010. Electrical and optical properties of polyaniline polyvinyl alcohol composite Films. *Indian Journal of Pure & Applied Physics, 48,* 425-428.

Cuba-Chiem LT, Huynh L, Ralston J, and Beattie DA. (2008) In situ particle film ATR FTIR spectroscopy of carboxymethyl cellulose adsorption on talc: binding mechanism, pH effects, and adsorption kinetics. *Langmuir, 24,* 8036-8044.

Dalla-Vecchia R, Sebrao D, Nascimento MG, Soldi V. 2005. Carboxymethylcellulose and poly(vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization. *Process Biochem. 40,* 2677–2682.

Kubo S, Kadla JF. 2003. The Formation of Strong Intermolecular Interactions in Immiscible Blends of Poly(vinyl alcohol) (PVA) and Lignin. *Biomacromolecules, 4,* 561-567.

Labidi NS, Djebail A. 2008. Studies of the mechanism of polyvinyl alcohol adsorption on the calcite/water interface in the presence of sodium oleate. *Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering, 7 (2),* 147-161.

Lazaridou A, Biliaderis CG. 2002. Thermophysical properties of chitosan, chitosan-starch and chitosan-pullulan films near the glass transition.*Carbohydrate polymer, 48,* 179-90.

Rivero, S, García MA, A, Pinotti. 2009. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering,* 90, 531-539.

Sarti B, Scandola M. 1995. Viscoelastic and thermal properties of collagen/poly(vinyl alcohol) blends. Biomaterials, 16, 785-792.

Taleb MFA, Abd El-Mohdy HL, Abd El-Rehim HA. 2009 Radiation preparation of PVA/CMC copolymers and their application in removal of dyes. *Journal of Hazardous Materials*, 168, 68-75.

Biotecnología

Estudio de la coagulación enzimática de micelas de caseína bovina inducida por endopeptidasas segregadas por *Bacillus sp. P45*

Apesteguía A[1], Mancilla Canales M[1], Quiroga M[1], Daroit D[2], Brandelli A[2], Risso P[1,3]

1: Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina.
2: Universidade Federal de Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.
3: IFIR-CONICET. Rosario, Argentina.
phrisso@yahoo.com.ar

Resumen: Se evaluó el proceso de coagulación enzimática de micelas de caseína bovina (MC). Las enzimas se obtuvieron a partir de *Bacillus* sp. P45 aislados de *Piaractus mesopotamicus*. La bacteria creció en medio de cultivo nutritivo por 48 h a 30 °C.
Se centrifugaron los cultivos, luego se adicionó sulfato de amonio al sobrenadante hasta alcanzar un 60 % de saturación. Por último se realizó una filtración en gel en una columna Sephadex G-100. Las fracciones que mostraron actividad proteolítica sobre la azocaseína se recolectaron para ensayos de hidrólisis proteica. Se aplicó un diseño de experimentos factorial para evaluar la significancia de la temperatura (T), pH y la concentración de enzima (E) sobre el tiempo de coagulación (t_c), la velocidad inicial de agregación (v_i) y la dimensión fractal (D_f). Se practicaron t-test ANOVA para determinar si los factores independientes estudiados resultaban significativos ($p < 0,05$) y se obtuvieron modelos matemáticos descriptivos y predictivos. Se determinó que t_c aumenta al incrementar el pH y al disminuir E y T. La v_i dependió en forma directa de T pero disminuyó al aumentar el pH y la E. El grado de compactación al final del proceso de coagulación, estimado a través de D_f, tiene una dependencia directa con la temperatura pero decrece al hacerlo el pH y E.
En conclusión, el pool enzimático P45 induce la coagulación enzimática de las MC, encontrándose ecuaciones modelo que permiten describir y predecir la cinética de coagulación y el grado de compactación de los coágulos obtenidos.

Palabras claves: coagulación enzimática, endopeptidasas bacterianas, micelas de caseína

Abstract: It was evaluated the enzymatic coagulation process of bovine casein micelles (MC). The involved enzyme was obtained from Bacillus sp. P45 isolated from Piaractus mesopotamicus. Bacillus sp. P45 was cultured in feather meal broth for 48 h at 30 °C. Cultures were centrifuged, and then ammonium sulfate was added to the supernatant until 60% saturation was reached. Finally a gel-filtration in Sephadex G-100 column was performed. Fractions showing proteolytic activity on azocasein were pooled for protein hydrolysis. We applied a factorial design of experiments to evaluate the significance of temperature (T), pH and enzyme concentration (E) on the coagulation time (t_c), the initial aggregation rate (v_i) and the fractal dimension (D_f). Through statistical parameters (t-test ANOVA) it was identified the factors and interactions that were significant ($p < 0.05$) and obtained descriptive and predictive mathematical models. It was found that t_c increase its value as the pH increases and E and T decrease. The v_i has a direct dependence on T but decreases as pH and E increase. The degree of compactness at the end of the coagulation process, estimated through D_f, has a direct dependence with T but it decreases with the pH and E. In conclusion, the enzymatic pool P45 induced the coagulation of MC, it could be found equations that model and predict the kinetics of this coagulation and the degree of compactness of aggregates obtained.

Key words: enzymatic coagulation, bacterial endopeptidases, casein micelles.

INTRODUCCIÓN

Las caseínas (CN), mayores componentes de las proteínas lácteas, son fosfoproteínas específicas de la leche y están compuestas de distintas fracciones: α_{S1}-, α_{S2}-, β- y κ-CN. Las mismas se encuentran en la leche en forma de micelas (MC), las que se mantienen estables debido a factores electrostáticos y estéricos [3]. En los últimos veinte años, se ha evidenciado que las CN presentes en los quesos, son fuente de péptidos bioactivos con potencial beneficio para la salud [4]. Estos péptidos están inactivos dentro de la secuencia de la proteína de origen y pueden ser liberados durante el procesamiento del alimento o digestión gastrointestinal. Una vez

liberados, los péptidos poseen diversas actividades biológicas, entre las cuales se destacan actividades regulatorias de los sistemas gastrointestinal, inmune, cardiovascular, y nervioso [5-6].

Las proteínas del suero lácteo, un subproducto reconocido como ingrediente alimentario con importante valor nutricional y funcional, han recibido interés y aceptación creciente como ingrediente funcional para alimentos [7]. El suero constituye cerca del 85-90% del volumen de leche utilizado para la elaboración de los quesos, y retiene cerca del 55% de los nutrientes de la leche. Formulaciones con proteínas de suero hidrolizadas son benéficas para los niños con intolerancia a la leche bovina.

Existe, por tanto, un significativo potencial para uso de hidrolizados de proteínas lácteas, caseínas o proteínas del suero, con miras al desarrollo de nuevos productos o ingredientes alimentarios. En la manufactura de productos lácteos uno de los procesos más frecuentemente utilizados es la gelación o coagulación de dichas proteínas, ya sea por el agregado de enzimas y/o por la adición de substancias o de cultivos bacterianos que modifican la acidez del medio [3].

En el caso de la coagulación enzimática, las enzimas utilizadas son endopeptidasas ácidas de origen animal, vegetal, fúngico u obtenidas por técnicas de ADN recombinante. Los productos de hidrólisis obtenidos con dichas enzimas poseen sabor amargo, lo que dificulta el aprovechamiento del suero lácteo tal como es obtenido. Es necesario utilizar técnicas de intercambio iónico y ultrafiltración para obtener concentrados o aislados proteicos del suero bovino (WPC o WPI), que encarecen la producción de dichos ingredientes alimentarios [8].

La hidrólisis enzimática bajo condiciones moderadas de pH (6-8) y de temperatura (40-60 °C) hace posible obtener componentes nutricionales bioactivos con propiedades funcionales aumentadas. Esta hidrólisis puede modificar las propiedades funcionales proteicas tales como la gelación/coagulación [5, 9].

Las proteasas son importantes enzimas hidrolíticas ampliamente usadas en las industria alimentaria para diferentes propósitos como la elaboración de quesos, productos de panadería, preparación de hidrolizados de soja y tiernizado de carnes [10-11]. Por lo tanto, la investigación de nuevas preparaciones obtenidas a partir de proteasas de diferentes fuentes y la profundización del conocimiento de sus productos derivados ha adquirido gran importancia.

Las proteasas microbianas son particularmente interesantes debido al alto rendimiento logrado durante su producción a través de métodos de cultivo bien establecidos. La producción de proteasas es una propiedad inherente de los microorganismos, y la explotación de la biodiversidad es considerada una alternativa favorable para proveer a la industria con una gran variedad de microorganismos y proteasas adecuadas para diversos propósitos [12].

Las bacterias del tracto intestinal de peces son consideradas especialmente como una fuente aún no explorada para la producción de enzimas [13]. En este sentido, se ha reportado que bacterias identificadas filogenéticamente como linajes de *Bacillus*, aisladas del conducto intestinal del *Piaractus mesopatamicus*, producen elevados niveles de proteasas extracelulares con potencial biotecnológico al ser cultivadas en medios relativamente económicos [14-16].

Estas endopeptidasas son activas en un rango restricto de pH (5-8) y son poco termotolerantes. Debido a sus velocidades de reacción intermedias, generan menos amargor en los hidrolizados de proteínas alimentarias que las endopeptidasas ácidas, por lo tanto, son de interés para la industria de los alimentos. Su baja termotolerancia es ventajosa para controlar su reactividad [10]. Además se ha comprobado que generan hidrolizados de CN con actividad biológica variada (poder antioxidante, actividad antibacteriana y antifúngica, poder reductor, actividad quelante), tópico de interés en el campo de los alimentos funcionales [17-18].

Los geles proteicos son responsables de la mayoría de las propiedades reológicas/texturales (ej. elasticidad, resistencia, dureza) de diversos productos alimenticios [19]. Durante la formación de un gel alimenticio, la composición del sistema, las interacciones entre sus componentes y las condiciones del proceso afectan las propiedades mecánicas de dicho gel y, por lo tanto, su textura [20]. Los cambios en la velocidad del proceso de coagulación pueden afectar las propiedades físicas del gel formado, como la textura y la capacidad de retención de agua del producto. Las propiedades mecánicas pueden explicarse considerando la estructura de los geles coloidales como una red de agregados fractales empaquetados o en forma de racimos [21].

El profundo conocimiento de la compleja relación entre los distintos componentes de una formulación alimenticia permitirá controlar y/o monitorear mejor la micro/nano estructura y, consecuentemente, manipular la textura de los alimentos procesados y formular nuevos productos con características diferenciadas. Sin embargo, los modelos para predecir sistemas complejos necesitan ser modificados

continuamente con el fin de relacionarlos con la textura del alimento más estrechamente. En este caso, la utilización de sistemas modelo es muy importante para proveer un marco científico [22].

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

La MC se reconstituyeron al 10 % $^{P}/_{V}$ a partir de leche en polvo descremada (SVELTY) en una solución acuosa de cloruro de calcio 10 mM en buffer Tris-HCl de pH a ensayar (6,5-8,5). La concentración proteica se determinó por espectrofotometría utilizando el método de Kuaye, el cual se basa en la modificación del espectro del aminoácido tirosina a altas longitudes de onda (λ) de la región UV en un medio alcalino fuerte (pH~13) [26].

Obtención del pool enzimático P45

El pool enzimático fue producido por el *Bacillus* sp. P45, cepa aislada del intestino del pez *Piaractus mesopatamicus*; las bacterias se inocularon en tubos de ensayo con infusión de cerebro-corazón (BHI) líquida (5 mL) y se dejaron 24 h a 30 ºC. Luego, una muestra de 1 mL se traspasó a otro tubo de ensayo con BHI (5 mL) y se volvió a incubar 24 h a 30 ºC. Por último, se tomaron 500 µL y se inocularon en un medio agar-BHI que se dejó en estufa por 24 h a 37 ºC. Al cumplirse dicho tiempo, se aisló una colonia del pasto y se inoculó en un nuevo medio agar-BHI. Seguidamente se puso en estufa por 24 h a 37 ºC. Luego se tomó una colonia aislada y se colocó en un erlermeyer conteniendo 100 mL de medio de cultivo con NaCl 0,5 g L^{-1}, KH_2PO_4 0,4 g L^{-1}, K_2HPO_4 0,3 g L^{-1} y harina de pluma de gallina al 1%, y se incubó 48 h a 30 ºC con agitación constante a 180 rpm en un agitador rotatorio. Posteriormente, se centrifugó durante 15 min a 3.000 g. El sobrenadante de cultivo fue precipitado con sulfato de amonio al 60 % de saturación, se dejó 1 h en agitación y luego1 h a 4 ºC. Posteriormente, se centrifugó 15 min a 10.000 g a 4 ºC. El precipitado se resuspendió en la menor cantidad posible de buffer Tris-HCl 20 mM pH 8. Por último, se realizó una cromatografía líquida en Sephadex G-100 (1 g en 100 mL de buffer Tris-HCl 20 mM pH 8). Las fracciones recolectadas con actividad proteolítica formaron un pool enzimático que denominamos proteasa P45.

Determinación de la actividad proteolítica de la proteasa P45

La actividad proteolítica se midió por el Método de Azocaseína [27]. La mezcla de reacción (300 µL) se preparó con 100 µL de proteasa P45, 100 µL de medio Tris-HCl 20 mM pH 8, 100 µL de azocaseína 1% $^{P}/_{V}$ (en buffer Tris-HCl). Se incubó a 37 ºC por 10 min y luego se adicionaron 500 µL de TCA 10% $^{P}/_{V}$ en todas las muestras. Se centrifugó 5 min a 10.000 g. El sobrenadante se mezcló con 200 µL de NaOH 1,8 N y se midió la absorbancia (A) a 420 nm. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de proteasa que causa un aumento de 0,1 en la A en las condiciones del ensayo.

Evaluación de la cinética de la coagulación enzimática mediante un diseño experimental

El ensayo de coagulación de las MC fue iniciado por adición de la enzima P45 (70 $U.mL^{-1}$), evaluando el efecto de relación de volúmenes enzima/sustrato (E/S), temperatura (T) y pH. Se realizaron diseños experimentales factoriales considerando como factores independientes la relación E/S ($^{V}/_{V}$: 1/240-1/60), T (35-55 ºC) y pH (6,5-8,5), manteniendo la concentración de CN y Ca^{2+} constantes. Como variables respuestas se evaluaron el tiempo al cual comienza la coagulación (t_c), la velocidad inicial de coagulación (v_i) y la dimensión fractal de los coágulos obtenidos (D_f). A través de los parámetros estadísticos obtenidos del t-test ANOVA se determinaron los factores e interacciones que resultaron significativos. Una vez determinados los mismos, se ajustaron las respuestas mediante el modelo correspondiente y se analizaron los residuos comprobándose normalidad e independencia de los mismos. Para visualizar el comportamiento de las variables respuestas se graficaron superficies y contornos convenientes para cada situación. Se utilizó regresión múltiple con variables codificadas para obtener modelos matemáticos descriptivos y predictivos del comportamiento del sistema.

La cinética de la coagulación enzimática se evaluó mediante los cambios de turbidez (La cinética de la coagulación enzimática se evaluó mediante los cambios de turbidez (τ) a través del tiempo luego de adicionada la proteasa P45. Los cambios de tamaño y/o grado de compactación de las MC se estudiaron basándose en la dependencia de la La cinética de la coagulación enzimática se evaluó mediante los cambios de turbidez (τ) (medida como A) con la longitud de onda (λ en el rango de 450-650 nm, rango en donde no hay absorción de los grupos cromóforos proteicos. El parámetro β, relacionado con el tamaño y grado de

compactación de las partículas y que puede ser utilizado para evaluar el estado de las partículas durante la coagulación, se define como:

$$\beta = 4{,}2 + \frac{\partial \log A}{\partial \log \lambda} \quad (1)$$

Donde $\partial \log A / \partial \log \lambda$ es la pendiente de un gráfico lineal de log A vs. Log λ obtenido a partir de espectros de absorción realizados a distintos tiempos (t) antes y durante la coagulación. A modo de ejemplo, se presenta la Figura 1.

La D_f, medida del grado de compactación de la malla del coágulo, se estimó como el máximo valor de β alcanzado (Figura 1A). La v_i se estimó como la pendiente de la porción lineal inicial de un gráfico de β vs. t, como se muestra en la Figura 1B. En este caso, el t_c se determinó como el tiempo al que comienza un aumento brusco de β (Figura 2).

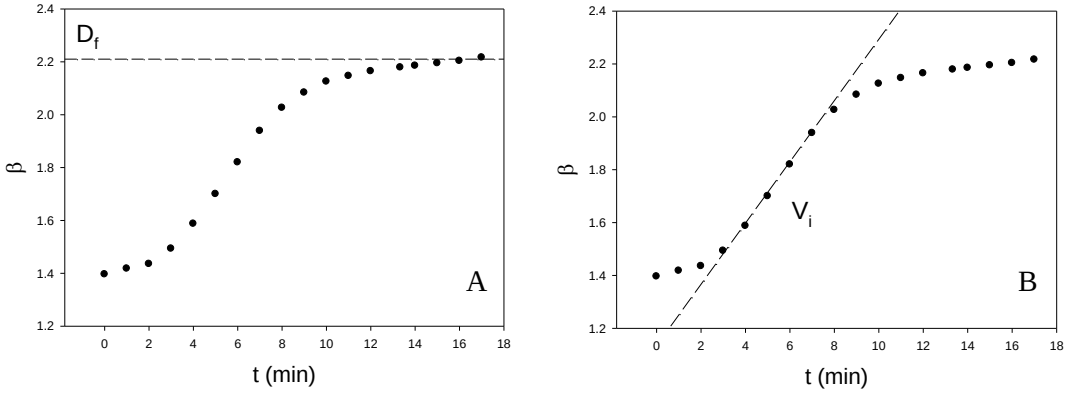


Figura 1. Ejemplo de la obtención de la D_f (A) y de v_i (B).

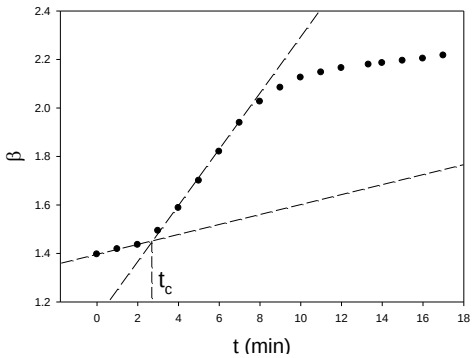


Figura 2. Ejemplo de la obtención de la t_c.

Análisis estadístico

Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado. Los valores reportados son los valores promedio ± su error estándar. El análisis estadístico fue hecho con los programas Sigma Plot 10.0, Minitab 16 y Origin Pro. La relación entre variables fue estadísticamente evaluada por análisis de correlación utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a valores de $p < 0{,}05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la cinética de la coagulación de las MC inducida por la proteasa P45

Para este estudio se aplicó un diseño factorial fraccionado para evaluar la significancia de los efectos de las variables independientes T, pH y la relación E/S sobre las variables dependientes t_c, v_i y D_f. En la Tabla I se muestran los valores de las variables independientes no codificadas y codificadas. Todos los ensayos se realizaron al menos por duplicado, a concentración de CN y Ca^{2+} constantes de 30 g/L y 10 mM, respectivamente.

Tabla I. Diseño de experimentos con los valores de las variables independientes no codificadas y codificadas

PRUEBA	pH	T (ºC)	E/S (V/V)
1	6,5 (-1)	40 (-1)	1/60 (+1)
2	8,5 (+1)	40 (-1)	1/60 (+1)
3	6,5(-1)	55 (+1)	1/60 (+1)
4	8,5(+1)	55(+1)	1/60 (+1)
5	6,5(-1)	40(-1)	1/240 (-1)
6	8,5(+1)	40(-1)	1/240 (-1)
7	6,5(-1)	55(+1)	1/240 (-1)
8	8,5(+1)	55(+1)	1/240 (-1)
9	6,5(-1)	40(-1)	1/60 (+1)
10	8,5(+1)	40(-1)	1/60 (+1)
11	6,5(-1)	55(+1)	1/60 (+1)
12	8,5(+1)	55(+1)	1/60 (+1)
13	6,5(-1)	40(-1)	1/240 (-1)
14	8,5(+1)	40(-1)	1/240 (-1)
15	6,5(-1)	55(+1)	1/240 (-1)
16	8,5(+1)	55(+1)	1/240 (-1)

La Tabla II muestra los valores p para t_c, donde se observa que todos los factores independientes estudiados resultaron significativos ($p < 0,05$), no así sus interacciones (valores no mostrados). Teniendo en cuenta este ANOVA, se analizó la totalidad de los datos mediante ajuste factorial obteniéndose la ecuación 2, que presenta el modelo para la variación de t_c, comprobándose independencia de los residuos.

Tabla II. Efectos y coeficientes estimados para t_c (unidades codificadas). $r^2 = 0,9875$

Término	Coeficiente	Efecto	p
Constante	1,940	0,4195	0,010
pH	1,460	0,4498	0,031
T	-1,181	0,4498	0,059
E/S	-1,955	0,4498	0,012

$$t_c = 1,94 + 1,46\ pH - 1,18\ T - 1,95\ E/S \qquad (2)$$

De acuerdo a la ecuación 2 y a los resultados de los gráficos de contorno y de superficie de respuesta correspondientes (gráficos no mostrados), se determinó que t_c aumenta al incrementar el pH y al disminuir E/S y T.

Al crecer T, aumenta la velocidad de los procesos que conducen a la coagulación y además se intensifican las interacciones de tipo hidrofóbico ($\Delta H>0$) que participan en dicho proceso y, por lo tanto, se acorta el t_c. Un incremento de E/S conduce a un aumento en la velocidad de hidrólisis proteica y, por lo tanto, a una disminución del tiempo necesario para que se desestabilicen las partículas de MC y comiencen a agregar y luego coagular. Al aumentar el pH inicial, se incrementa la densidad de carga superficial negativa de las MC y con ello aumenta su estabilidad electrostática, con el consiguiente retardo para coagular.

En la Tabla III se muestra la evaluación ANOVA de los valores de p para v_i, donde se observa que los 3 factores independientes resultaron significativos ($p < 0,05$) y además un término cuadrático para el pH.

Tabla III. Efectos y coeficientes estimados para vi (unidades codificadas). $r^2 = 0,9821$

Término	Coeficiente	Efecto	p
Constante	0,38800	0,018321	0,000
pH	-0,05700	0,007242	0,004
T	0,08075	0,007242	0,002
E/S	0,07550	0,007242	0,002
pH*pH	-0,11975	0,019701	0,009

Teniendo en cuenta el ANOVA anterior, se analizó la totalidad de los datos mediante ajuste factorial obteniéndose la ecuación 3, que presenta el modelo para la variación de v_i, comprobándose independencia de los residuos.

$$v_i = 0,388 - 0,057\ pH + 0,080\ T - 0,075\ E/S - 0,119\ pH*pH \quad (3)$$

A partir de la ecuación 3 y de los gráficos de superficie de respuesta y de contorno correspondientes (gráficos no mostrados) puede observarse que v_i dependió en forma directa de T pero disminuyó al aumentar el pH inicial y E/S.

Los efectos de las variables independientes T y pH sobre v_i son opuestos a los observados para t_c, ya que los cambios en dichas variables que conducen a un menor t_c, inducen un aumento en la velocidad inicial de coagulación. Al aumentar E/S, aumenta el grado de hidrólisis y, por lo tanto, el tamaño medio de la partículas proteolizadas, lo que retrasa la formación del coágulo.

En la Tabla IV se muestran los valores de p para D_f, los que indican que las variables independientes las 3 variables resultaron significativas, pero no sus interacciones (valores p para las interacciones no mostrados).

Tabla IV. Efectos y coeficientes estimados para D_f (unidades codificadas). $r^2 = 0,8396$

Término	Coeficiente	Efecto	p
Constante	224,981	0,02758	0,000
pH	-0,09437	0,02926	0,023
T	0,13137	0,02926	0,006
E/S	-0,11063	0,02926	0,013

Tomando en consideración el ANOVA anterior, se examinó la totalidad de los datos mediante ajuste factorial obteniéndose la ecuación 4, que presenta el modelo para la variación de D_f, comprobándose independencia de los residuos.

$$D_f = 2,4249 - 0,094\ pH + 0,1313\ T + 0,11\ E/S \quad (4)$$

Según el modelo, el grado de compactación de los coágulos (D_f) se incrementa al aumentar la T pero disminuye con el pH y la E/S. Un aumento de T favorecería el establecimiento de las interacciones hidrofóbicas que participan en la estructuración del gel. A mayor pH, mayor densidad de carga superficial negativa, lo que dificultaría la desestabilización electrostática y el establecimiento de las interacciones entre las partículas proteolizadas, conduciendo a la formación de agregados menos compactos. Partículas hidrolizadas de menor tamaño, debidas a un incremento de E/S, conducen a la formación de agregados más compactos.

CONCLUSIONES

Se obtuvo un pool enzimático, denominado proteasa P45, a partir del cultivo del *Bacillus* sp. P45 en un medio de cultivo preparado con un desecho de la industria avícola (plumas de gallina), con acción proteolítica sobre las CN de la leche.

Se determinó, utilizando un diseño de experimentos, que los valores óptimos de pH y T para la acción coagulante de la proteasa P45 sobre las MC fueron 7,03 y 49 ºC, respectivamente, para una concentración de CN de 30 g/L y de ion calcio 10 mM.
Estos resultados representan una evaluación previa a la utilización de la proteasa P45 como enzima coagulante con vista a la elaboración de productos lácteos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lucey, J.A., *Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels.* Journal of Dairy Science, 2002. 85(2): p. 281-294.
2. Mellema, M., et al., *Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels.* Advances in Colloid and Interface Science, 2002. 98(1): p. 25-50.
3. Walstra, P., R. Jenness, and H.T. Badings, *Dairy chemistry and physics*. Dairy chemistry and physics, ed. A.S.A. (ed). 1984, New York, USA: John Wiley & Sons. 467.
4. Farrell, J.H.M., et al., *Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology?* Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2006. 11(2-3): p. 135-147.
5. Silva, S.V. and F.X. Malcata, *Caseins as source of bioactive peptides.* International Dairy Journal, 2005. 15(1): p. 1-15.
6. Korhonen, H. and A. Pihlanto, *Bioactive peptides: Production and functionality.* International Dairy Journal, 2006. 16(9): p. 945-960.
7. Madureira, A.R., et al., *Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties.* Food Research International, 2007. 40(10): p. 1197-1211.
8. Kinsella, J.E., D.M. Whitehead, and E.K. John, *Proteins in Whey: Chemical, Physical, and Functional Properties.* Advances in Food and Nutrition Research, 1989. 33: p. 343-438.
9. Hartmann, R. and H. Meisel, *Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications.* Current Opinion in Biotechnology, 2007. 18(2): p. 163-169.
10. Rao, M.B., et al., *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases.* Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998. 62(3): p. 597-635.
11. Sumantha, A., C. Larroche, and A. Pandey, *Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-GradenProteases: A Perspective.* Food Technology and Biotechnology, 2006. 44(2): p. 211-220.
12. Gupta, R., Q.K. Beg, and P. Lorenz, *Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2002. 59(1): p. 15-32.
13. Esakkiraj, P., et al., *Evaluation of protease-producing ability of fish gut isolate Bacillus cereus for aqua feed.* Food and Bioprocess Technology, 2009. 2(4): p. 383-390.
14. Daroit, D.J., A.P.F. Corrêa, and A. Brandelli, *Keratinolytic potential of a novel Bacillus sp. P45 isolated from the Amazon basin fish Piaractus mesopotamicus.* International Biodeterioration & Biodegradation, 2009. 63(3): p. 358-363.
15. Daroit, D.J., A.P.F. Corrêa, and A. Brandelli, *Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium Bacillus sp. P45.* International Biodeterioration & Biodegradation, 2011. 65(1): p. 45-51.
16. Giongo, J., et al., *Keratinolytic proteases of Bacillus species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007. 23(3): p. 375-382.
17. Corrêa, A.P.F., et al., *Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011. 91(12): p. 2247-2254.
18. Hidalgo, M.E., et al., *Physicochemical and antioxidant properties of bovine caseinate hydrolysates obtained through microbial protease treatment.* International Journal of Dairy Technology, 2012. 65(3): p. 342-352.
19. Foegeding, E.A., *Rheology and sensory texture of biopolymer gels.* Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2007. 12(4-5): p. 242-250.
20. Sabadini, E., M.D. Hubinger, and R.L. Cunha, *The effects of sucrose on the mechanical properties of acid milk proteins-k-carrageenan gels.* Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2006. 23: p. 55-65.
21. Shih, W.-H., et al., *Scaling behavior of the elastic properties of colloidal gels.* Physical Review A, 1990. 42(8): p. 4772.

22. Foegeding, A.E., et al., *Sensory and mechanical aspects of cheese texture.* International Dairy Journal, 2003. 13(8): p. 585-591.
23. Langton, M. and A.-M. Hermansson, *Image analysis of particulate whey protein gels.* Food Hydrocolloids, 1996. 10(2): p. 179-191.
24. Zheng, C., D.-W. Sun, and L. Zheng, *Recent applications of image texture for evaluation of food qualities--a review.* Trends in Food Science & Technology, 2006. 17(3): p. 113-128.
25. Franklin, S.E. and D.R. Peddle, *Texture analysis of digital image data using spatial cooccurrence.* Computers & Geosciences, 1987. 13(3): p. 293-311.
26. Kuaye, A.Y., *An ultraviolet spectrophotometric method to determine milk protein content in alkaline medium.* Food Chemistry, 1994. 49(2): p. 207-211.
27. Hummel, B.C.W., et al., *Quantitative enzymic assay of human plasminogen and plasmin with azocasein as substrate.* Analytical Biochemistry, 1965. 11(3): p. 532-547.
28. Zheng, C., D.-W. Sun, and L. Zheng, *Recent applications of image texture for evaluation of food qualitiesâ€"a review.* Trends in Food Science and Technology, 2006. 17(3): p. 113-128.

Clarificación de jugo de uva *Isabella* con extractos enzimáticos producidos por una cepa de *A. niger* aislada en la provincia de Misiones

Brousse M.M., Cruz N.E. , Martos M.A.

Facultad de Ciencias Exactas Qcas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones.
brousse.mariamarcela@gmail.com

Resumen: *A. niger* Nº 300, aislado de frutas cítricas en descomposición en la provincia de Misiones, Argentina, fue capaz de producir enzimas pécticas mediante fermentación sumergida.
En el presente trabajo se estudió el efecto de la concentración de enzima y la temperatura en función del tiempo de clarificación de jugo de uva de la variedad *Isabella*, utilizando el extracto enzimático producido por *A. niger* 300. La clarificación se realizó con tres concentraciones de enzima (1, 10, 20 % v/v) y tres temperaturas (30, 40 , 50°C), hasta 2 h. Posteriormente se evaluó, en las condiciones seleccionadas, la variación de la viscosidad, turbiedad y densidad óptica durante el proceso de clarificación.
El extracto enzimático de *A. niger* 300 fue capaz de clarificar jugo de uva. El análisis de varianza reveló que los tres factores estudiados (concentración de enzima, temperatura y tiempo de incubación), influyeron significativamente en el proceso de clarificación ($p<0,05$). El mayor porcentaje de clarificación se obtuvo a 40°C, con una concentración enzimática del 20% (v/v), durante 2 h. En estas condiciones, los tres parámetros evaluados (viscosidad, turbiedad y densidad óptica) disminuyeron en función del tiempo de clarificación. Los valores experimentales fueron ajustados a ecuaciones cuadráticas, obteniéndose buenos ajustes.

Palabras Clave: *Aspergillus niger*, pectinasas, jugo de uva, clarificación.

Abstract: *Aspergillus niger* Nº 300, isolated from decay citrus peels in the province of Misiones, Argentina, was able to produce pectinases by submerged fermentation.
In this work it was studied the effect of enzyme concentration and temperature as a function of clarification time of grape juice of *Isabella* variety, using the enzyme extract produced by *A. niger* 300. Clarification was carried out with three concentrations of enzyme (1, 10 and 20 % v / v) and three temperatures (30, 40 and 50 °C), until 2 h. Later it was evaluated, in the conditions selected, the variation of viscosity, turbidity and optical density during the clarification process.
The enzymatic extract of *A. niger* 300 was able to clarify apple juice. Analysis of variance revelead that the three factors studied (enzyme concentration, temperature and clarification time) significantly influenced in the clarification process ($p< 0.05$).The highest percentage of clarification was obtained at 40 ° C, with an enzyme concentration of 20% (v / v), during 2 h. Under these conditions, the three parameters evaluated (viscosity, turbidity and optical density), decreased with clarification time. Experimental values were fitted to quadratic equations, yielding good fits.

Key words: *Aspergillus niger*, pectinases, grape juice, clarification.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son proteínas cuya acción biológica consiste en la catálisis de las reacciones del metabolismo celular, las que transcurrirían muy lentas sin su intervención. Las enzimas hacen que los procesos industriales sean eficientes y menos costosos ya que tienen un alto grado de especificidad y adaptabilidad. En los últimos años su uso en gran cantidad de industrias de alimentos, ha adquirido gran relevancia.
Las enzimas pécticas juegan un rol importante en tecnología de los alimentos, principalmente en el procesamiento de jugos de frutas y vinos. Los jugos de uvas presentan partículas dispersas así como coloides.
Las partículas mayores que 1 μm dan al jugo la característica de turbidez. Por otro lado los coloides compuestos principalmente de polisacáridos con diámetros entre 0.001 a 0.1 μm dan una apariencia de opalescencia al jugo (Girard y Fukumoto 2000). Este efecto se debe a la presencia de pectinas, las que pueden degradarse por la acción de enzimas pectinolíticas presentes en el propio jugo o adicionadas al mismo, permitiendo que estas partículas se separen por sedimentación o filtración, dejando un jugo claro (Costa *et al*. 2007, Croak y Corredig 2006, Sin y col. 2006).

La clarificación es una etapa importante en el procesamiento de jugos de frutas y la mayoría de las veces es realizada ya sea por microfiltración, por tratamiento enzimático o mediante agentes clarificantes como gelatina, bentonita, silica, o una combinación de estos compuestos (Chatterjee *et al.* 2004).
Las enzimas pécticas comerciales son producidas principalmente por hongos del género *Aspergillus* (*A. niger*, *A. oryzae*, *A. wentii* y *A. flavus*) (Aguilar y Huitrón 1990). El hongo filamentoso *A. niger* tiene la ventaja de poseer el status GRAS (generalmente aceptado como seguro) que permite el uso de metabolitos, incluyendo sus enzimas extracelulares en las industrias de alimentos (Taragano y Pilosof 1999).
Estudios previos demostraron que un hongo, *A. niger* Nº 300, aislado de frutas cítricas en descomposición en la provincia de Misiones, Argentina, es capaz de producir enzimas pécticas (poligalacturonasa, pectinesterasa y pectinliasa) en un medio de cultivo líquido formulado en base a sales, sulfato de amonio como FN y pectina de citrus comercial como única fuente de carbono y energía (Martos *et al.* 2009). Otras enzimas capaces de hidrolizar otros polímeros de la pared celular tales como celulasas y xilanasas, también fueron detectadas en los sobrenadantes.
Este trabajo tuvo como objetivo estudiar, en primera instancia, el efecto de la concentración de enzima y la temperatura en función del tiempo de clarificación del jugo de uva de la variedad *Isabella*, utilizando el extracto enzimático de *A. niger* 300. Una vez obtenidas las condiciones óptimas de clarificación, se estudio la variación de la viscosidad, la turbiedad y la densidad óptica durante el proceso de clarificación del jugo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del extracto enzimático

Microorganismo: *A. niger* aislado de frutas cítricas en descomposición en la provincia de Misiones, Argentina.
Medio de mantenimiento: KH_2PO_4, 4 g/L; Na_2HPO_4, 6 g/L; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g/L; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,01 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g/L; $(NH_4)_2SO_4$, 2 g/L; H_3BO_3, 10 μg/L; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 10 μg/L; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 70 μg/L; pectina cítrica (Parafarm, Buenos Aires Argentina), 5 g/L; agar (Britania, Buenos Aires, Argentina), 15 g/L, pH 5,0.
Medio de fermentación: posee la misma composición de sales que el medio de mantenimiento pero sin el agregado de agar, pectina cítrica, 20 g/L (Martos *et al.* 2009).
La pectina cítrica fue lavada para eliminar los azúcares y otros excipientes presentes en la pectina comercial. Los lavados se realizaron con alcohol 70 % v/v en HCl (0,05 N) (Cavalitto y col. 1996).
La FCE (pectina), los fosfatos y el resto de las sales, fueron esterilizaros por separado, previo ajuste del pH. Las tres fracciones se esterilizaron en autoclave 15 min a 121 ºC. El medio se reconstituyó antes de su utilización.
Inóculo: a partir del hongo desarrollado en medio de mantenimiento a 30 ºC, durante 7 días, se preparó una suspensión de esporos en Tween 80 al 0,05 %, a partir de la cual se realizaron las diluciones de manera de obtener una concentración de 1,25 × 107 esporos/mL. El recuento del número de esporos se realizó en cámara de Neubauer**.**
Fermentación: se inocularon frascos Erlenmeyers de 500 mL que contenían 95 mL del medio de fermentación con 5 mL de la suspensión de esporos de manera de obtener una concentración inicial de $1,25 \times 10^6$ esporos/mL de medio. Los mismos se incubaron a 30 °C en baño termostatizado rotatorio (New Brunswick, modelo 676; 1,27 cm de excentricidad) a 180 rpm, hasta 7 días. La biomasa se separó por filtración (papel Whatman # 1) y el filtrado enzimático, al que se lo denominó extracto enzimático (EE), se mantuvo a –18 °C hasta su utilización como fuente de enzima.

Preparación del jugo de uva

Para la obtención de jugo de uva, se utilizaron 13 kg de uva *Isabella*, la misma fue despalillada en forma manual y posteriormente prensada en marmita extractora durante 2 h. El jugo obtenido se envasó en caliente en botellas de vidrio. Este proceso se realizó en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Cerro Azul, Misiones.

Ensayos de clarificación

Se ensayo la capacidad del pool de pectinasas de *A. niger* 300 de clarificar jugo de uva.
1. *Efecto de la temperatura y la concentración de enzima en la clarificación de jugo de uva*

En una primera etapa se estudió el efecto de la temperatura y la concentración de enzima en función del tiempo de clarificación de jugo de uva *Isabella* con el EE de *A. niger*.
Para el proceso de clarificación, se trabajó con el EE al 1 %, 10 % y 20 % v/v. Cada una de estas experiencias fue realizada a las siguientes temperaturas: 30°C, 40°C y 50°C, en baño termostatizado. Al erlenmeyer control se le adicionó agua en lugar del EE. Se tomaron muestras cada 30 min. El proceso de clarificación se llevó a cabo hasta las 2 h, considerando que este es el tiempo de clarificación informado por otros autores (Lee *et al.* 2006; Sing *et al.* 2006; Rai *et al.* 2004).
Las muestras fueron tomadas de cada tubo de ensayo a los diferentes tiempos y colocadas en Baño María por un tiempo de 5 min a 100 °C, a los efectos de inactivar la enzima. Posteriormente, se centrifugó a 2350g durante 10 min (centrífuga Rolco CM-3070, Rolco, S. R. L., Argentina). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y para los cálculos se tomaron los valores promedios. Como criterio de la evolución de la clarificación se midió la densidad óptica (DO) a 540 nm (espectrofotómetro Labnics UV-VIS).

2. *Estudio de parámetros fisicoquímicos en la clarificación de jugo de uva con el EE de A. niger*
En una segunda etapa se procedió a determinar la variación de la densidad óptica, turbiedad y viscosidad, en función del tiempo de clarificación del jugo de uva con el EE de *A. niger*, a la temperatura y con la concentración de enzima seleccionadas en la etapa anterior.
Para el proceso de clarificación se siguió el mismo procedimiento que se describió anteriormente.
Densidad óptica: se midió a 540 nm en espectrofotómetro Labnics UV-VIS.
Turbiedad: se determinó en un turbidímetro portátil marca LaMotte, modelo TC-3000 (U.S.A.) y los resultados se reportan en unidades nefelométricas de turbidez (NTU).
Viscosidad: fue determinada a los diferentes tiempos con viscosímetro Cannon Fenske, serie 150, a temperatura ambiente (28±1°C) y los resultados se expresaron en cSt.
En todos los casos, las experiencias se realizaron por triplicado y se tomaron para los cálculos los valores promedios.

Análisis de datos
Los valores experimentales de la primera etapa, se evaluaron mediante ANOVA factorial y los resultados de la segunda etapa se evaluaron a través de un ANOVA simple, para determinar si existían diferencias significativas en el rango estudiado.
Los valores experimentales de densidad óptima, turbiedad y viscosidad se ajustó a ecuaciones de segundo orden y la bondad de ajuste de los modelos se evaluó con los parámetros R^2 (coeficiente de determinación), RMSE (raíz cuadrada del error medio cuadrático) y E % (error porcentual promedio) dado por las ecuaciones:

$$\mathrm{RMSE} = \left[\frac{\sum_{i=1}^{n} (c_{cal} - c_{exp})_n^2}{n} \right]^{0,5} \quad (1)$$

$$E\,\% = \frac{\sum_{i=1}^{n} \frac{\left|(c_{cal} - c_{exp})_n\right|}{c_{exp\,n}}}{n} \cdot 100 \quad (2)$$

c_{cal} : valor calculado
c_{exp} : valor experimental
n: número de determinaciones
Un buen ajuste es indicado por valores pequeños de RMSE, $R^2 > 0,85$ y E % < 10 % (Park *et al*. 2002; Vega-Gálvez *et al*. 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la temperatura y la concentración de enzima en la clarificación de jugo de uva

El EE producido por *A. niger* 300 en medio líquido, presentó una actividad PG de 7,08 UE/mL. Otras enzimas como PE y PL también fueron detectadas en dicho extracto.

De estudios previos se demostró que la enzima PG presente en el EE exhibió mayor actividad en un rango de pH entre 4,5 y 5,0 (datos aún no publicados), sin embargo el presente estudio se realizó al pH inicial propio del jugo (3,6), el cual no fue modificado.

En la Figura 1a, b y c, se presenta el incremento en la densidad óptica (ΔDO_{540}) obtenidos a los distintos tiempos de clarificación, a las tres concentraciones de enzimas estudiadas, para 30ºC, 40ºC y 50ºC, respectivamente.

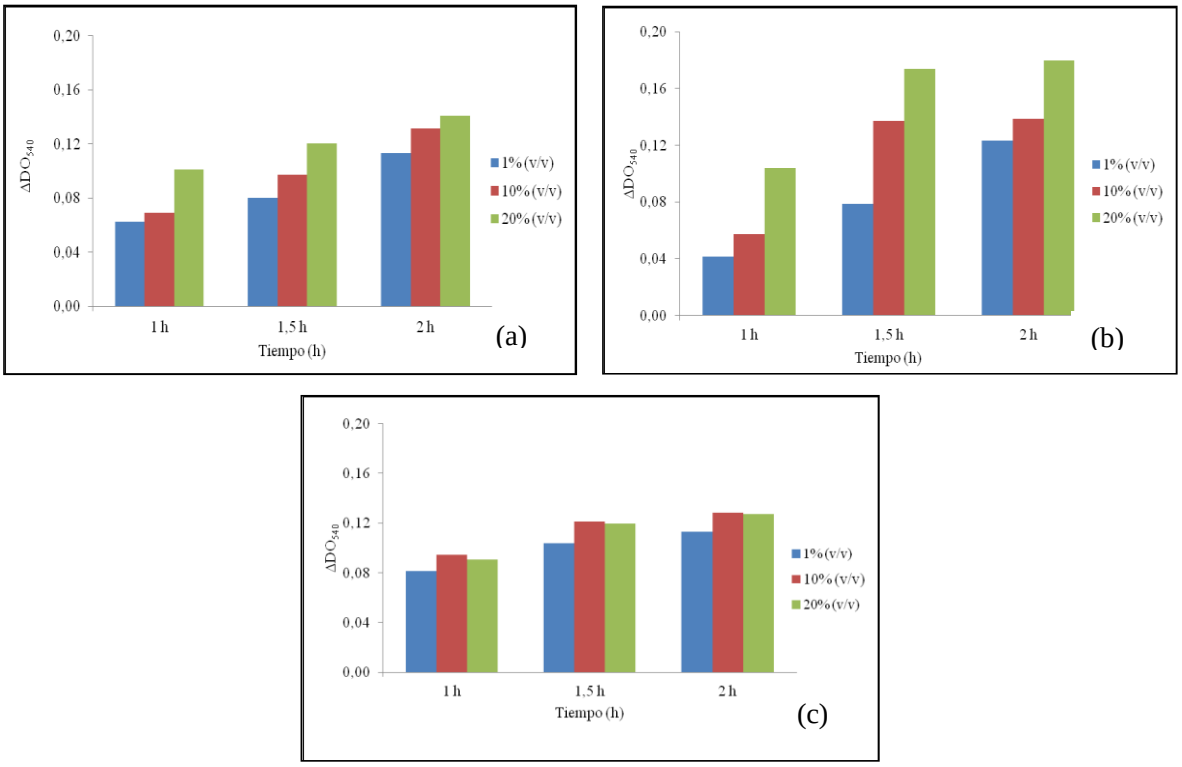
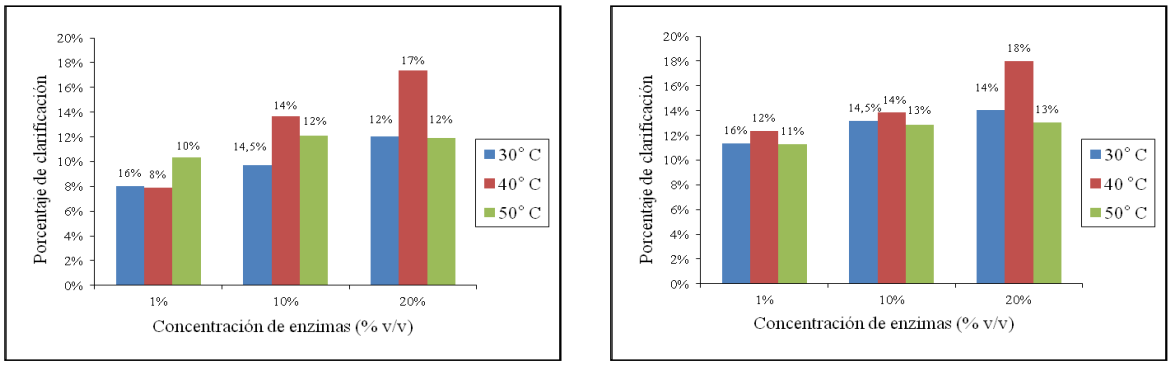


Figura 1: Incremento en la densidad óptica (ΔDO_{540}) en función del tiempo de clarificación del jugo de uva *Isabella*, a las tres concentraciones de enzimas estudiadas. a: 30 ºC (a), 40 ºC (b) y 50 ºC (c).

El EE de *A. niger* fue capaz de clarificar jugo de uva. El ANOVA factorial, mostró que todos los factores estudiados tuvieron efectos estadísticamente significativos ($p < 0,05$) sobre la DO, medida a 540 nm (Fig. 1). En la Figura 1a y b se observa un aumento en ΔDO_{540} en función del tiempo de clarificación, a las tres concentraciones de enzimas estudiadas. Para un determinado tiempo, se obtuvo un mayor incremento en la ΔDO al aumentar la concentración de enzima. Los mayores títulos se obtuvieron a las 2 h y con una concentración de enzima del 20 % (v/v). A 50°C (Fig. 1c), se observó un menor incremento en la ΔDO_{540} en función del tiempo a las tres concentraciones de EE. Esta disminución en la clarificación de jugo de uva observada a esta temperatura se pudo asociar a fenómenos de inestabilidad enzimática al pH propio del jugo de uva.

De estudios previos se demostró que la enzima PG presente en el EE fue estable hasta 50 ºC, durante 60 min, pero dichos ensayos fueron realizados a pH 5,0.

En la Figura 2 a y b se presenta la evolución de la clarificación (valores porcentuales de ΔDO_{540}), en función de la concentración de EE, a las tres temperaturas estudiadas durante 1,5 y 2 h, respectivamente.



(a) (b)

Figura 2: Evolución de la clarificación (valores porcentuales de ΔDO_{540}) del jugo de uva *Isabella* en función de la concentración de EE a las tres temperaturas estudiadas, a 1,5 h (a) y 2 h (b).

Como se observa en la Figura 2 a y b, el mayor porcentaje de clarificación se presentó a 40° C a las tres concentraciones de EE estudiados.
Para la clarificación enzimática del jugo de sapodilla con Pectinex 3X L de Aspergillus *niger*, se reportaron valores similares de temperatura y tiempos óptimos de clarificación (Sin *et al.* 2006).
La mejor combinación de las distintas variables del proceso en la clarificación del jugo de banana con enzimas comerciales pectolíticas, Pectinex Ultra SP-Land y enzimas amilolíticas, AMG 300L, fue 0,084%, temperatura de 43,2 ° C, y el tiempo de incubación 80 min. Estos resultado reportados por Lee *et al.* 2006, son similares a los reportados en este trabajo, en temperatura y tiempo de clarificación, aunque la concentración de enzima en la clarificación del jugo de uva es marcadamente superior.

Evolución del proceso de clarificación de jugo de uva con el EE de A. *niger*
En base a los resultados obtenidos en la etapa anterior y considerando que el proceso de clarificación realizado a las 1,5 h y 2 h, con 20 % de enzima y a 40 °C, no presentaron diferencias significativas, se utilizó el menor tiempo para realizar las siguientes pruebas de clarificación.
La evolución del proceso de clarificación (valores de DO a 540 nm) de jugo de uva *Isabella*, en función del tiempo del tratamiento enzimático, realizado a 40 °C, con 20 % de la solución enzimática, se presenta en la Figura 3. Los resultados se muestran como un promedio de tres repeticiones.

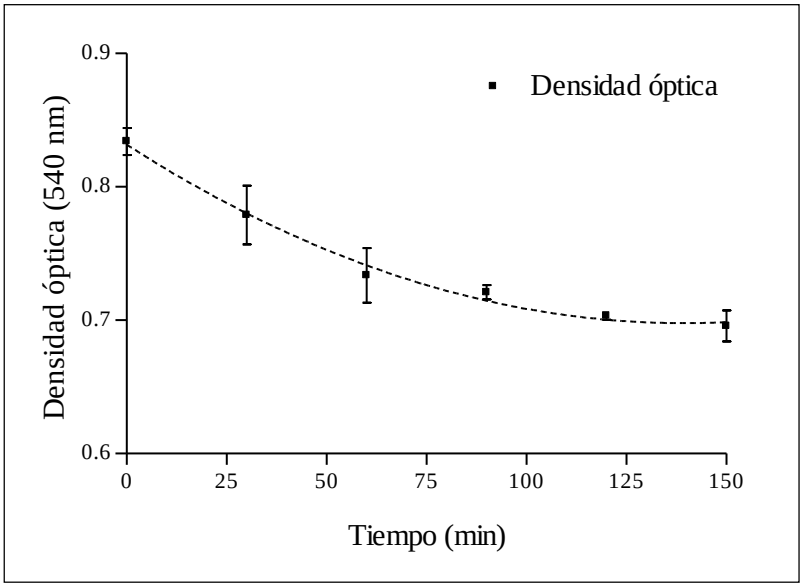


Figura 3: Variación de la densidad óptica en función del tiempo de clarificación con una concentración de enzima de 20% v/v y a 40° C.
Los puntos de coordenadas representan el valor promedio de tres repeticiones y las barras el desvío estándar.

La DO disminuyó al aumentar el tiempo. Un ANOVA simple determinó que existe diferencias significativas entre las densidades ópticas medias de un nivel de tiempo a otro ($p > 0,05$) para un nivel de confianza del 95%. Se ajustaron los valores experimentales a una ecuación cuadrática y se determinó la bondad del ajuste, obteniéndose un RMSE de 4,5 e^{-3} y un error porcentual de 0,53.
La ecuación obtenida fue:

$$DO = (0{,}832 \pm 7e^{-3})t^2 + (0{,}001 \pm 2{,}2e^{-4})t - (1e^{-5} \pm 1{,}4e^{-6}) \qquad R^2 = 0{,}94$$

El efecto del chitosan, bentonita y gelatina como agentes clarificantes, en el jugo de manzana, uva, limón y naranja disminuyeron la absorbancia a 540 nm en un tiempo de 90 minutos (Sandipan Chatterjee *et al.* 2004). Este tiempo es la mitad de la que se obtiene en la clarificación enzimática del jugo de uva de la variedad *Isabelle.*

En la Figura 4 se presentan los valores experimentales y el ajuste para la turbiedad y la viscosidad como función del tiempo de clarificación, realizado a 40 °C, con 20 % de la solución enzimática. Los ANOVAS simples determinaron que existe diferencias significativas entre los valores medios de turbiedad y de viscosidad, a diferentes tiempos ($p>0,05$) para un nivel de confianza del 95%. Se ajustaron los valores experimentales a ecuaciones cuadráticas y se determinó la bondad del ajuste por medio del RMSE y el error porcentual. Los datos y sus error estándar obtenidos fueron los que se muestran en la Tabla Nº 1.

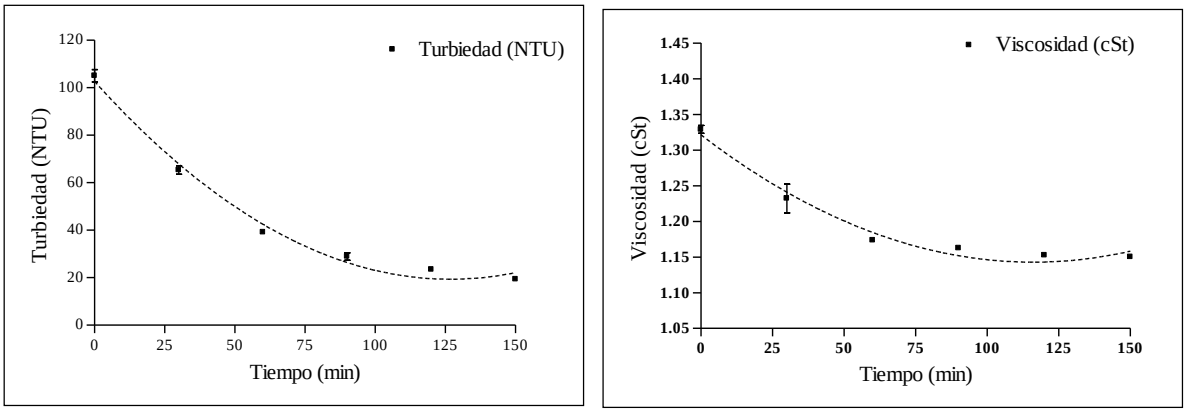


Figura 4: Variación de la turbiedad y viscosidad en función del tiempo a una concentración de enzima de 20% v/v y a 40° C.
Los puntos de coordenadas representan el valor promedio de tres repeticiones y las barras el desvío estándar.

Tabla 1: Términos calculados a partir de la ecuación cuadrática y la bondad del ajuste del modelo.

	a	b	c	R^2	RMSE	ERROR %
Turbiedad	102,7±1,85	-1,31±0,06	$5e^{-3}$±$3,7e^{-4}$	0,99	2,96	9,04
Viscosidad	1,32±7e-3	$-3e^{-3}$±$2e^{-4}$	$1e^{-5}$±$1,3e^{-6}$	0,97	9 e^{-3}	0,77

Todas las propiedades disminuyeron significativamente a medida que aumentó el tiempo de clarificación (Fig. 4). Estos parámetros pudieron ser ajustados mediante polinomios de segundo orden (Tabla 1).
La aplicación de ecuaciones polinómicas en el estudio de la variación de propiedades en función del tiempo en clarificaciones de jugos, es frecuentemente encontrada en la bibliografía (W.C. Lee *et al.* 2006; P. Rai *et al.* 2004).

CONCLUSIONES

El extracto enzimático de *A. niger* fue capaz de clarificar jugo de uva. Los diferentes factores estudiados durante el proceso de clarificación de jugo de uva *Isabella* con el extracto enzimático de *A. niger*, tales como la concentración de la enzima, la temperatura y tiempo de incubación, influyeron significativamente en dicho

proceso. El mejor tratamiento empleado para la clarificación del jugo de uva se obtuvo con una concentración enzimática del 20% v/v, a 40° C, durante 2 h. La densidad óptica, la turbiedad y la viscosidad son tres importantes propiedades que se midieron durante el proceso de clarificación. Estas tres propiedades disminuyeron significativamente a medida que aumentó el tiempo de clarificación. Estos parámetros pudieron ser ajustados mediante polinomios de segundo orden.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar G, Huitrón C. 1990. Constitutive exopectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon sources. Biotechnology Letters, 12:655-660.

Babsky NE, Toribio JL, Lozano JE. 1986. Influence of storage on the composition of clarified apple juice concentrate. Food Science, 51:5648.

Chatterjee S, Chatterjee BP, Guha AK. 2004. Clarification of Fruit Juice with Chitosan. Process Biochemistry, 39: 2229-2232.

Cavalitto SF, Arcas JA. y Hours RA. 1996. Pectinase production profile of Aspergillus foetidus in solid state cultures at different acidities. Biotechnology Letters, 18:251-256.

Costa JAV, Colla E, Magagnin G, Oliveria dos Santos L, Vendruscolo M, Bertolin TE. 2007. Simultaneous amyloglucosidase and exo-polygalacturonase production by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. Brazilian Archives of Biology and Technology, 50 (5):759-766.

Croak S, Correding M. 2006. The role of pectin in orange juice stabilization: Effect of pectin methylesterase and pectinase activity on the size of cloud particles. Food Hydrocolloids, 20:961-965

Girard B y Fukumoto LR. 2000. Membrane Processing of Fruit Juices and Beverages: A Review, Critical Review in Food Science and Nutrition, 40(2): 91-157.

Lee WC, Yusof S, Hamid NSA, Baharin BS. 2006. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). Journal of Food Engineering, 73:55–63.

Maldonado MC, Strasser de Saad AM, Callieri DA. 1989. Regulatory aspects of the synthesis of polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger sp*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 9:101-110.

Martos MA, Martinez Vazquez F, Benassi FO, Hours RA. 2009. Production of pectinases by *A. niger*: Influence of fermentation conditions. *Braz.* Arch. Biol. Technology, 52:567-572.

Park KJ,Vohnikova Z, Brod FPR. 2002. Evaluation of drying parameters and desorption isotherms of garden mint leaves (*Mentha crispa* L.). Journal of Food Engineering, 51(3):193-199.

Rai P, Majumdar GC, DasGupta S. 2004. Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface S methodology. Journal of Food Engineering, 64: 397–403.

Sandipan Chatterjee, Sudipta Chatterjee, Bishnu P. Chatterjee, Arun K. Guha. 2004. Clarification of fruit juice with chitosan. Process Biochemistry, 39:2229–2232.

Sin HN, Yusof S, Hamid NSA y Rahman RA. 2006. Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. Journal of Food Engineering, 73:313-319.

Taragano VM, Pilosof AMR. 1999. Application of Doehlert designs for water, pH and fermentation time optimization for *A. niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. Enzyme and Microbial Technolgy, 25:411-419.

Vega-Gálvez A, Lara-Aravena E, Lemus-Mondaca R. 2006. Isotermas de adsorción de harina de maíz. Ciência e Tecnología de Alimentos (Brasil), 26(4):821-827.

Efecto de la aireación en la actividad fermentativa de *Candida stellata* durante la producción de sidra

Estela-Escalante, WD[1,2]., Rychtera, M[1]., Melzoch, K[1]., Cortes-Miranda, P[2]., Elguera-Hilares, A[2].

1. Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Faculty of Food and Biochemical Engineering. Institute of Chemical Technology Prague. Technická 5, 166 28. Praha 6, Dejvice. Czech Republic.
2. Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial, Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac. Av. Arenas 121, Abancay–Apurimac, Perú.
waldire@post.cz

Resumen: El efecto de la aireación en la actividad fermentativa de *Candida stellata* RIVE 3-16-1 fue estudiado con la finalidad de evaluar la síntesis de compuestos químicos de importancia sensorial durante la producción de sidra. Para ello, la cepa fue cultivada en frascos Erlenmeyer conteniendo jugo de manzana estéril y sin aroma. Los compuestos químicos producidos durante la fermentación en frascos agitados (200 min^{-1}) y estáticos fueron determinados por cromatografía gaseosa y líquida. Los resultados mostraron que la agitación del medio de cultivo aumenta la producción global de alcoholes superiores (620 mgL^{-1}) y etil acetato (176.0 ± 5.0 mgL^{-1}) comparado al cultivo estático (486 mgL^{-1} y 17.0 ± 1.5 mgL^{-1}) respectivamente. Por el contrario, la producción de glicerol (3.8 ± 0.3 gL^{-1}) y ácido acético (150.0 ± 6.5mgL^{-1}) resultaron ser mayores en cultivo estático comparado al cultivo agitado (1.9 ± 0.1 gL^{-1} y 90.0 ± 3.5 mgL^{-1}) respectivamente. Experimentos adicionales de cultivo batch realizados en biorreactor con flujo de aire constante (25.0 h^{-1}) reportaron una tasa específica de crecimiento de 0.13 h^{-1} y una producción máxima de etanol de 27.02 gL^{-1} durante la fase de fermentación aerobia de azúcares. La aireación en este caso promueve el crecimiento, disminuye el rendimiento de etanol y, provoca el consumo de ácido acético y glicerol una vez que los azúcares hayan sido agotados. Los mejores resultados en términos de aceptabilidad de las bebidas fermentadas se obtuvieron cuando se cultivaron estáticamente. El control de la aireación durante la fermentación puede usarse para controlar la síntesis de compuestos químicos de importancia sensorial en la producción de sidra.

Palabras clave: *Candida stellata*, fermentación alcohólica, alcoholes superiores, etil acetato, cultivo por lote.

Abstract: The effect of aireation on the fermentative activity of *Candida stellata* RIVE 3-16-1 was studied in order to evaluate the synthesis of chemical compounds of sensory importance during cider fermentation. The strain was cultured in Erlenmeyer flasks containing sterile and aroma removed apple juice. The chemical compounds produced during fementation in agitated (200 min^{-1}) and static flasks were determined by gas and liquid chromatography. The results showed that agitation of culture medium increases the overall production of higher alcohols (620 mgL^{-1}) and ethyl acetate (176.0 ±5.0 mgL^{-1}) compared to static cultivation (486 mgL^{-1} and 17.0 ± 1.5 mgL^{-1}) respectively. Additional experiments in batch cultivation carried out in bioreactor with constant air flow (25.0 h^{-1}) reported a specific growth rate 0.13 h^{-1} and maximum ethanol production 27.02 gL^{-1} during the aerobic fermentation phase. Aireation promotes growth, diminishes the ethanol yield and provokes consumption of acetic acid and glycerol once sugars have been depleted. The best results in terms of aceptability of fermented beverages were obtained when cultivated in static fashion. Control of aireation during fermentation can be used to control synthesis of chemical compounds of sensory importance in cider production.

Key words: *Candida stellata*, alcoholic fermentation, higher alchols, ethyl acetate, batch cultivation.

INTRODUCCIÓN

Candida stellata es comúnmente aislada de mostos de uva y sobrevive durante la fermentación espontánea de vinos por periodos largos (Fleet *et al.*, 1984; Jolly *et al.*, 2003). Esta levadura muestra un carácter fuertemente fructofílico y osmofílico (Benda, 1988; Magyar y Toth, 2011). *C. stellata* es una levadura Crabtree positivo (Rodicio y Heinisch, 2009) así, dependiendo de la concentración de oxígeno y glucosa en el medio muestra un comportamiento metabólico variado. A condiciones anaeróbicas o de limitación de

oxígeno sucede la fermentación alcohólica (Van Dijken y Scheffers, 1986). A condiciones totalmente aerobias se observa un metabolismo repiro-fermentativo mixto cuando la concentración de azúcar excede un cierto valor límite que en el caso de *Saccharomyces cerevisiae* por ejemplo es muy bajo, aproximadamente 1 mM (Kappeli, 1986; Verduyn, 1991). Condiciones que conducen a la fermentación de azúcar resultan en la producción de etanol, ácido acético, glicerol y otros compuestos menores y consecuentemente disminuye el rendimiento en biomasa (Beudeker *et al.*, 1990). Los compuestos menores producidos durante la fermentación incluyen alcoholes superiores, esteres, ácidos grasos volátiles, compuestos carbonilos, etc., y representan menos del 1% w/v del azúcar utilizado. Debido a estas pérdidas metabólicas, la fermentación completa de hexosas rinde sólo 94–96% del rendimiento teórico máximo de etanol (Ribereau-Gayon *et al.*, 2000).

Estudios realizados sobre la actividad metabólica y fermentativa de algunas levaduras no-*Saccharomyces* mostraron que *Candida stellata* podría influir positivamente al sabor y aroma de bebidas alcohólicas (Ciani y Maccarelli, 1998; Ciani y Ferraro, 1998). *Candida stellata* exhibe un comportamiento peculiar de fermentación caracterizado por una tasa de fermentación muy baja y alta producción de compuestos secundarios de la fermentación como glicerol, acetoína, acetaldehído y ácido succínico. Se ha reportado que *Candida stellata* es un potente productor de glicerol a condiciones aerobias y anaerobias de crecimiento, con una mayor producción a condiciones anaerobias (Ciani *et al.*, 2000). Otras investigaciones han reportado que esta levadura puede producir concentraciones de etanol suficientemente altas para completar la fermentación alcohólica de mosto de uva (Clemente-Jimenez *et al.*, 2004).

Durante la fermentación alcohólica las levaduras producen muchos compuestos químicos de importancia sensorial. Entre ellos, los ésteres son producidos a partir de alcoholes, ácidos grasos, co-enzima A y alcohol acetil transferasas (Nordstrom, 1962). Los esteres con producidos intracelularmente y dependiendo de la longitud de sus cadenas difunden hacia fuera de la célula de levadura (Nykanen *et al.*, 1977; Suomalainen, 1981). Por otro lado, los alcoholes superiores son producidos catabólicamente a partir de la degradación de aminoácidos importados o anabólicamente vía su biosíntesis a partir de la utilización de la fuente de carbono (Hammond, 1993). Los aminoácidos son convertidos a sus correspondientes α-cetoácidos por transaminación (leucina a ácido α-cetoisocaproico, valina a ácido α-cetoisovalerico e, isoleucina a ácido α-ceto-β-metilvalerico) (Dickinson y Norte, 1993; Dickinson *et al.*, 1997). Alternativamente, estos α-cetoácidos pueden ser producidos a través de la degradación de glucosa (Dickinson *et al.*, 1997).

El presente estudio reporta sobre el efecto de la aireación sobre el metabolismo fermentativo y producción de compuestos de importancia sensorial por *Candida stellata* RIVE 3-16-1 cultivado en jugo de manzana. En los experimentos se consideraron básicamente dos condiciones de cultivo tomando en cuenta su importancia tecnológica, a condiciones de limitación de oxígeno muy bajo (cultivo estático) y a condiciones de limitación de oxígeno (cultivo agitado). Adicionalmente se realizaron, cultivos batch en biorreactor con la finalidad de evaluar el efecto del flujo de aire constante en el comportamiento fermentativo de *Candida stellata* RIVE 3-16-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo y mantenimiento

La cepa *Candida stellata* RIVE 3-16-1 adquirido de la colección de levaduras del Instituto de Investigación de Vinicultura y Enología de Bratislava, República Eslovaca fue usado en los experimentos. La cepa fue mantenida en agar extracto de malta a 7ºC y renovado cada tres meses.

Síntesis de compuestos de importancia sensorial

En los experimentos se usó jugo de manzana concentrado, esterilizado por ultrafiltración y sin aroma adquirido de Severofrukt a.s, Terezin, República Checa. El jugo fue reconstituido con agua estéril hasta alcanzar una concentración de azúcar de 12.8 % peso/volumen y pH 3.8 (Downing, 1988). Las fermentaciones se realizaron en cultivo agitado y estático (sin agitación) a 28ºC en frascos Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 250 ml de medio. En las fermentaciones realizadas en agitación los frascos fueron agitados a 200 min^{-1} durante 8 días y aquellos fermentados estáticamente el tiempo de fermentación fue de 15 días aproximadamente. Todas las fermentaciones se consideraron terminadas cuando el azúcar en el medio fue consumido. Todos los experimentos fueron realizados a 28ºC. La propagación del inoculo se realizó en 100 ml de jugo de manzana estéril a 28ºC durante 24 horas. Los frascos fueron agitados a 200 min^{-1} en un agitador orbital. La biomasa fue separada por centrifugación (3000 min^{-1} durante 10 minutos) y luego

lavada tres veces con solución fisiológica estéril. Los medios de fermentación fueron inoculados con 1.0 ± 0.1 gramos de células basado en peso húmedo.

Cultivo batch en biorreactor

Jugo de manzana de variedad Rubin conteniendo 13 % peso/volumen de azúcares totales y pH 3.8 fue utilizado en estos experimentos. El jugo fue extraído por presión y luego colocado en envases de vidrio de 10 L. La pasteurización del jugo se realizó en un termostato a 65–70 ^{o}C durante 10 horas (incluyendo el tiempo de calentamiento y enfriado) con la finalidad de eliminar la microflora y los compuestos volátiles varietales (El-Nemra *et al.*, 1988; Su y Wiley, 1998). Subsecuentemente, al jugo se adicionó 1.2 gL^{-1} de KH_2PO_4 y 1.2 gL^{-1} de $(NH_4)_2SO_4$ como fuente de fósforo y nitrógeno para promover el crecimiento celular.

Los cultivos fueron realizados en un biorreactor de 2 L (BIOSTAT–B. Braun International, Alemania) conteniendo 1.5 litros de jugo de manzana. El equipo estuvo provisto de un pH-metro, termómetro, agitador y un electrodo de medición de oxígeno disuelto. El biorreactor estuvo conectado a una unidad de regulación y medición micro-DCU-300. Los parámetros que fueron mantenidos constantes todo el proceso de cultivo fueron la temperatura (18 ^{o}C), frecuencia de agitación (300 min^{-1}) y flujo de aire 25 Lh^{-1} (0.2 mol O_2h^{-1}). El tiempo de cultivo se consideró hasta observar el incremento del valor de oxígeno disuelto a su valor inicial (100%).

El inoculo fue propagado en 80 mL de medio sintético de la siguiente composición: glucosa 8.0 gL^{-1}; peptona 10.0 gL^{-1}; KH_2PO_4 1.2 gL^{-1}; $(NH_4)_2SO_4$ 1.2 gL^{-1} y extracto de levadura 10.0 gL^{-1}. El pH se ajustó a 3.8. La propagación celular se realizó en un agitador orbital a 150 min^{-1} durante 48 horas a 28 ^{o}C. Subsecuentemente, las células fueron separadas por centrifugación (3000 min^{-1} durante 10 minutos), lavadas con solución fisiológica estéril y finalmente inoculadas en el biorreactor.

Métodos analíticos

Los compuestos volátiles (alcoholes superiores y esteres) producidos durante la fermentación fueron analizados por GC (Hewlett-Packard 5890II), equipado con una columna HP5 (30m x 0,32mm) y detector FID. Las muestras fueron centrifugadas y luego filtradas con micro-membranas de 0.45 µm. La extracción de compuestos volátiles se realizó mediante el método de microextracción con diclorometano (Ortega et al., 2001). Finalmente 1µl de cada extracto fue inyectado en la columna del equipo. El ácido acético, succínico, málico, etanol, glicerol, fructosa y glucosa fueron analizados por HPLC (bomba LCP 4000), equipado con una columna Batres 250 x 8 mm (Ostion LGKS 0800 H^{+}) y un detector RID. Las condiciones de análisis fueron: temperatura de la columna 80 °C, fase móvil 5 mM H_2SO_4, tasa de flujo 1mLmin^{-1}. Las muestras después de la centrifugación (10000 min^{-1}) y filtración fueron diluidas con agua desmineralizada (1:3) antes de inyectar al equipo.

Análisis sensorial y estadístico

La evaluación sensorial de sidras fermentadas tanto estáticamente como en agitación se realizaron usando un análisis descriptivo. Atributos como sabor, aroma y olor fueron evaluados usando una escala Hedónica de cinco puntos (1 = me desagrada mucho y, 5 = me agrada mucho). Las muestras fueron evaluadas por un panel entrenado de 10 jueces, (hombres entre 25-30 años). La evaluación sensorial fue realizado según Meilgaard *et al.* (1999). Los datos de la evaluación sensorial fueron presentados como promedios de los puntajes de los jueces. La prueba *"t"* estándar se utilizó para evaluar la significancia estadística ($P<0.01$) de las diferencias observadas entre los puntajes de las bebidas fermentadas (cultivadas en agitación y estáticamente). El análisis estadístico se realizó con ayuda del programa Statistica v.8.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo a condiciones estáticas y de agitación

El suministro de oxígeno en cultivos agitados es un factor limitante. El oxígeno es necesario para mejorar el metabolismo y así completar exitosamente la fermentación. Los compuestos producidos durante la fermentación de jugo de manzana por *Candida stellata* RIVE 3-16-1 en cultivos estáticos y agitados se muestran en la **Tabla 1**. Adicionalmente se muestran los compuestos analizados en sidras fermentadas con diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* obtenidas por diferentes autores. Marcada diferencia se observó en la producción de glicerol en cultivo estático (3.8 ± 0.3 gL^{-1}) y agitado (1.9 ± 0.1 gL^{-1}). Las condiciones aerobias promoverían la respiración celular y así disminuiría la producción de glicerol. *C. stellata* es conocida como una gran productora de glicerol, es capaz de producir hasta 11.76 gL^{-1} (Ciani y

Maccarelli, 1998). Desde el punto de vista tecnológico una mayor producción de glicerol es favorable por influir positivamente en la calidad sensorial de bebidas alcohólicas al impartir un ligero sabor dulce y contribuye a la complejidad del sabor del vino en bajas concentraciones (Nieuwoudt *et al.,* 2002; Prior *et al.,* 2000).

Los alcoholes superiores, mayormente son perjudiciales para la calidad sensorial de bebidas fermentadas con algunas excepciones. Sin embargo, a bajas concentraciones contribuirían positivamente al aroma y sabor de sidras, vinos y cervezas. En nuestros experimentos se observó una mayor producción de alcoholes superiores totales a condiciones de agitación (620.9 mgL^{-1}) comparado con las condiciones estáticas (486.0 mgL^{-1}) de cultivo. Desde el punto de vista sensorial, los alcoholes sensoriales confieren olores y sabores fuertes y pungentes (Swiegers y Pretorius, 2005; Swiegers *et al.,* 2005) así, concentraciones mayores a 400 mgL^{-1} contribuirían negativamente a la calidad organoléptica de vinos (Rapp y Mandery, 1986). Con excepción del 2-feniletanol el cual imparte un aroma floral (Ribereau-Gayon *et al.,* 2006), cuyo límite de percepción es 10 mgL^{-1} (Rous *et al.,* 1983), el resto de alcoholes superiores imparten características sensoriales desagradables (Rapp y Mandery, 1986; Ribereau-Gayon *et al.,* 2006).

Los esteres son indudablemente los compuestos aromáticos más importantes en bebidas alcohólicas; la presencia de éstos determina la calidad sensorial. El etil acetato es probablemente el más importante debido a su alta concentración comparada con el resto de esteres. Imparte un aroma ligeramente frutado o a solvente, dependiendo de su concentración. Los resultados de nuestros experimentos mostraron que la agitación mejoró la producción de etil acetato (176.0 ±5.0 mgL^{-1}) comparado con el cultivo estático (17.0 ±1.5 mgL^{-1}). Los esteres de acetato son producidos en altas concentraciones durante la etapa temprana de fermentación (Henschke y Jiranek, 1993). Desde el punto de vista sensorial, concentraciones de etil acetato menores a 80.0 mgL^{-1} contribuyen positivamente al aroma y sabor de vinos (Ribereau-Gayon, 1978). Por el contrario, concentraciones sobre 200.0 mgL^{-1} impartirían un sabor a vinagre (Dequin *et al.,* 2003). Por otro lado, los esteres etílicos de ácidos grasos como el etil decanoato (olor floral) son también importantes en el bouquet de vinos y otras bebidas fermentadas.

El análisis estadístico de los resultados de aroma, sabor y olor mostraron una diferencia significativa ($P<0.01$) entre los dos tipos de bebidas fermentadas. Los resultados de los panelistas han descrito a la bebida fermentada en agitación con sabor intenso como a solvente, ligeramente ácido y perfil sensorial no balanceado, pero no desagradable. Por otro lado, se describió a la bebida fermentada en agitación sin cuerpo, deficiente de aroma y sabor. Las bebidas fermentadas estáticamente tuvieron una aceptabilidad global basada en los atributos evaluados.

Tabla 1. Compuestos de importancia sensorial producidos por *Candida stellata* RIVE 3-16-1 cultivado en jugo de manzana a 28ºC en cultivo estático y agitado. Además, compuestos típicos encontrados en sidras y jugo de manzana.

Compuestos (mgL^{-1})	Tipo de cultivo con *Candida stellata*[a]		Compuestos analizados en sidras fermentadas con *Saccharomyces cerevisiae*	Compuestos analizados en jugo de manzana
	Agitado	Estático		
Glicerol*	1.9 ± 0.1	3.8 ± 0.3	4.05 ± 0.13[1]; 2.59 ± 1.7[2]	0.0[5]
1-Propanol	58.0 ± 3.0	11.0 ± 2.0	20.01 ± 0.35[1]; 27.3 ± 13.0[2]	7.0[6]
1-Butanol	2.4 ± 0.5	3.0 ± 0.5	6.99 ± 0.04[1]; 6.1 ± 0.7[2]	4.50 ± 0.23[4]
2-Butanol	1.5 ± 0.2	2.0 ± 0.2	–	–
2-Metil-propanol	113.0 ± 4.0	154.0 ± 6.0	22.17 ± 0.08[1]; 34.8 ± 8.9[2]	0.75 ± 0.04[4]
3-Metil-butanol	162.0 ± 5.0	137.0 ± 3.5	232.00 ± 13.80[3]	2.11 ± 0.11[4]
2-Metil-butanol	130.0 ± 4.0	154.0 ± 3.5	94.8 ± 0.2[+]; 173.0 ± 41.1[+]	9.0[6]
2-Feniletanol	154.0 ± 4.5	25.0 ± 2.0	7.8 ± 0.39[1]; 131.5 ± 55.3[2]	0.46 ± 0.02[4]
Etil acetato	176.0 ± 5.0	17.0 ± 1.5	231.06 ± 33.09[1]; 114.6 ± 35.5[2]	0.57 ± 0.03[4]
Butil acetato	n.d	tr	0.27 ± 0.02[4]	0.58 ± 0.03[4]
Isoamilacetato	n.d	12.0 ± 2.0	16.66 ± 1.0[4]	2.48 ± 0.12[4]
Etil decanoato	2.9 ± 0.5	n.d	1.50 ± 0.09[4]	0.01 ± 0.002[4]
Ácido acético	90.0 ± 3.5	150.0 ± 6.5	900.0 ± 140.0[1]; 282.93 ± 16.9[4]	0.0[5]
Ácido succínico*	1.7 ± 0.15	1.2 ± 0.1	200.0 ± 30.0[1]; 0.5 ± 0.06[2]	0.0[5]

*g/L., tr.: trazas, n.d: no detectado, [a]Resultados obtenidos en este estudio. [1]Valores encontrados en sidras fermentadas con *S. cerevisiae* (Suarez *et al.*, 2005). [2]Valores encontrados en sidras (Picinelli *et al.*, 2000). [3]Valores encontrados en sidras fermentadas con *S.cerevisiae* (Jarvis *et al.*, 1995). [4]Valores promedio (Wang *et al.*, 2004). [5]Valores promedio (Cabranes *et al.*, 1998). [6]Valores promedio (Souci *et al.*, 2000). [+]Alcoholes amilicos: 3-Metil-butanol+2-Metil-butanol (Suarez *et al.*, 2005; Picinelli *et al.*, 2000). Compuestos no reportados (–).

Cultivo batch en biorreactor a flujo de aire constante

El cultivo batch a flujo de aire constante permite el suministro constante de oxígeno al medio. Sólo el oxígeno disuelto en la fase líquida está disponible para las células. En nuestros experimentos, la tasa de flujo de aire 25.0 Lh^{-1} (0.2 mol O_2h^{-1}) se ha mantenido constante durante todo el tiempo de cultivo (232 horas). En las **Figuras 1** y **2** se muestran el curso del consumo de oxígeno, crecimiento celular, cambio de pH y la síntesis y utilización de sub productos del metabolismo. El oxígeno es el parámetro más importante el cual determina el balance entre la actividad fermentativa y respiratoria en muchas levaduras. Los azúcares fueron rápidamente agotados, siendo la glucosa consumida primero y luego la fructosa; sin embargo, la tasa de consumo de fructosa fue mayor que la de glucosa. *Candida stellata* es una levadura fructofílica y por eso la utilización de fructosa fue más rápida. Durante la fermentación aerobia, etanol y glicerol fueron principalmente producidos (**Figura 2**). La producción de ácido acético se observó principalmente al final del periodo de cultivo cuando el etanol se convirtió en la fuente principal de carbono.

Por otro lado, la concentración de biomasa alcanzó los 19.6 gL^{-1} al final del cultivo y la tasa de crecimiento específico a estas condiciones fue 0.13 h^{-1}. Ciani *et al.* (2000) encontró que la presencia de oxígeno incrementa la tasa de crecimiento en aproximadamente tres veces (desde 0.05 a 0.16 h^{-1}) cuando cultivó *C. stellata* en frascos agitados a 150 min^{-1}, en medio sintético comparado a condiciones anaerobias. En nuestro estudio, una vez que los azúcares fueron consumidos, el etanol y glicerol fueron simultáneamente utilizados como fuente de carbono y, luego también el ácido acético. Esta manifestación también fue observada cuando *S. cerevisiae* fue cultivada en glucosa como fuente de carbono en cultivo batch a condiciones aerobias, aquí la glucosa fue inicialmente fermentada a etanol, la cual, en una segunda fase de crecimiento sirvió como fuente de carbono y energía (Fiechter *et al.*, 1981). El consumo de etanol y la respiración disminuyen a medida que la concentración de oxígeno en el medio desciende (Wiebe *et al.*, 2008).

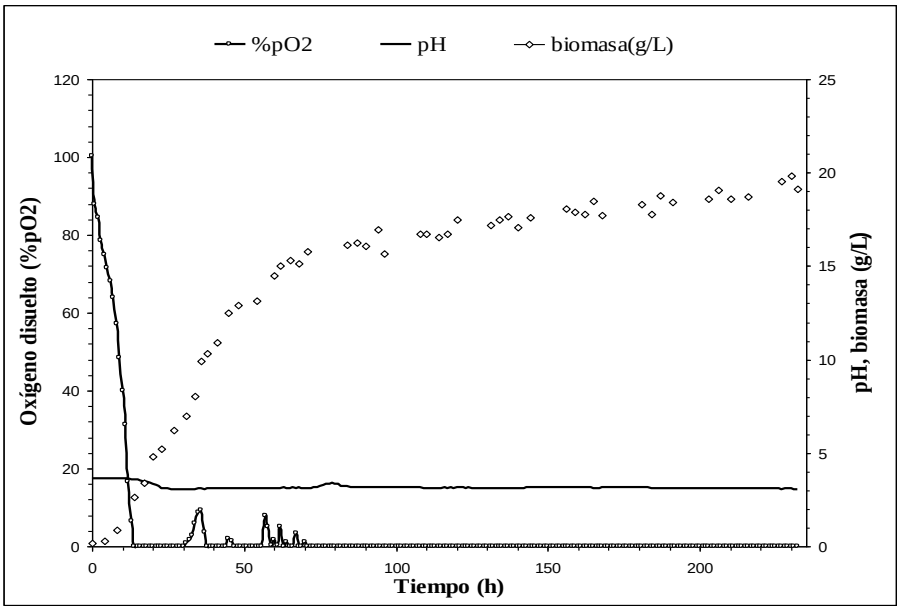


Figura 1. Cultivo de *Candida stellata* RIVE 3-16-1 a flujo de aire constante (25 Lh^{-1}) a 18 ºC.

El consumo de azúcares durante la fermentación aerobia resultó en la producción máxima de etanol (27 gL^{-1}) y glicerol (1.2 gL^{-1}) antes de ser consumidos aeróbicamente (**Figura 2**). Después del consumo de azúcar, el etanol y glicerol producidos sirvieron como fuente de carbono para mantener el crecimiento celular. A partir de esta etapa, la concentración de oxígeno disuelto cayó a cero y permaneció así hacia el final del cultivo. Se produjo ácido acético al final del cultivo durante la asimilación de etanol. La producción de glicerol por levaduras constituiría una respuesta a la alta osmolaridad del medio (Hohmann, 2002), ya que de otro modo perderían agua (osmoregulación). El jugo de manzana normalmente contiene alta concentración de azúcar y puede provocar este fenómeno en *Candida stellata* RIVE 3-16-1.

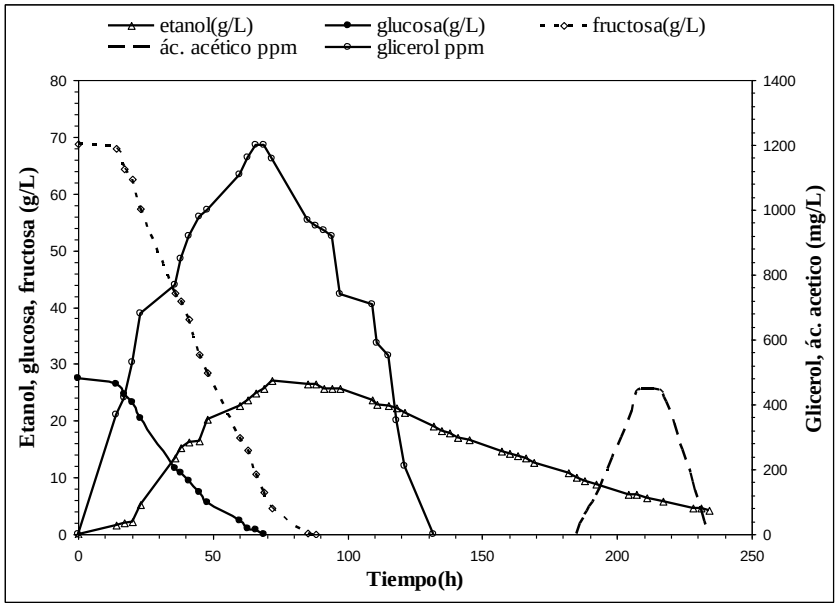


Figura 2. Consumo de azúcar y metabolitos producidos durante el cultivo batch de *Candida stellata* RIVE 3-16-1 a flujo de aire constante (25 l/h) a 18ºC.

Experimentos realizados por Sahoo y Agarwal (2002), con *Candida magnoliae* mostraron que el crecimiento celular asi como la producción de glicerol son fuertemente afectados por el suministro de oxígeno. El mejoramiento de la tasa de transferencia de oxígeno resultó en el incremento del crecimiento celular y el rendimiento en glicerol.

Tabla 2. Compuestos utilizados y producidos por *Candida stellata* RIVE 3-16-1 durante el cultivo batch a flujo constante de aire a 18ºC.

Concentración inicial de azúcares y ácido málico (g/L)						
fructosa	Glucosa	sucrosa	ácido málico			
70.95	22.6	35.5	5.02			
Compuestos finales (g/L)						
fructosa	glucosa	etanol	glicerol	ác. acético	ác. succínico	ác. málico
traces	traces	4.3	0	0	1.0±0.3	2.6±0.6
Alcoholes superiores y etil acetato producidos (mg/L)						
1-propanol	propil acetato	2-metil propanol	3-metil Butanol	2-metil butanol	Etil acetato	
traces	0	1.7±0.04	5.6±0.05	3.0±0.05	13.1±0.06	

Azúcar utilizado (S), biomasa final (X), rendimiento ($Y_{X/S}$, $Y_{E/S}$), tasa de crecimiento (μ)				
S	X	$Y_{X/S}$	$Y_{E/S}$	μ
124.8	19.6	0.11	0.22	0.13

$Y_{X/S}$: g. de biomasa/g.azúcar; $Y_{E/S}$: g. de etanol/g.azúcar; μ: tasa de crecimiento específico (h^{-1}); X: biomasa seca final (gL^{-1}); S: azúcar total consumido (gL^{-1}).

Durante la fermentación aerobia, alcoholes superiores y esteres de acetato son producidos. En nuestros resultados, se confirmó con los compuestos residuales que se encontraron al final del cultivo (**Tabla 2**). En la segunda etapa (asimilación aerobia de etanol) probablemente los alcoholes superiores sirvieron también como fuente de carbono para mantener el crecimiento celular. Desde el punto de vista tecnológico, las

fermentaciones deberían ser detenidas una vez que los azúcares sean consumidos o cuando la concentración de etanol haya alcanzado el valor deseado. La aireación excesiva durante la fermentación conllevaría al incremento de la biomasa celular y como consecuencia disminuir la producción de etanol y compuestos volátiles.

CONCLUSIONES

La concentración de azúcar y oxígeno son los factores más importantes que afectan el metabolismo de *Candida stellata* RIVE 3-16-1. A altas concentraciones de glucosa, sucede la fermentación alcohólica incluso si está presente oxígeno en cantidades suficientes. En cultivos agitados realizados en frascos Erlenmeyer, la transferencia de oxígeno es un factor limitante así, la concentración de oxígeno disuelto en la fase líquida sería muy baja. Estas condiciones influyen en la síntesis de sub-productos de la fermentación en *Candida stellata* RIVE 3-16-1. El oxígeno afecta la síntesis de glicerol, incrementa la síntesis de alcoholes superiores totales y esteres, especialmente etil acetato. La capacidad de síntesis de alcoholes superiores y esteres a estas condiciones dependería también de la cepa. Adicionalmente, la producción de ácido acético disminuyó a condiciones de agitación, esto sería ventajoso dado que las bebidas alcohólicas con baja acidez volátil son deseables. Desde el punto de vista sensorial, el cultivo estático resultó en bebidas fermentadas de mejor aceptabilidad y la mejor alternativa para fermentar el jugo de manzana.

En cultivos batch realizados a flujo de aire constante, el oxígeno mejora el crecimiento celular y como consecuencia la velocidad de la fermentación pero por el contrario afecta el rendimiento de etanol. En este caso, una excesiva aireación debería ser evitada para mejorar su rendimiento. Así mismo, *Candida stellata* RIVE 3-16-1 produce etanol, glicerol durante la fermentación aerobia, los cuales son luego consumidos y el oxígeno promueve el consumo. Desde el punto de vista tecnológico, el control de la tasa de aireación sería una herramienta importante para controlar la síntesis de sub productos de la fermentación. El oxígeno juega un rol muy importante en el metabolismo de *Candida stellata* RIVE 3-16-1, y sólo en pequeñas cantidades sería beneficioso para la síntesis de sub productos de la fermentación.

BIBLIOGRAFÍA

Benda I. 1988. Concernant la fructophilie et l'osmotolérance de la levure *Candida stellata* (synonyme *Torulopsis stellata*). Mitteilungen Klosterneuburg Rebe und Wein, Obstbau und Fruchteverwertung, 38(2): 60–65.

Beudeker RF, van Dam HW, van der Plaat JB, Vellenga K. 1990. Developments in bakers' yeast production. In: Verachtert, H. and De Mot, R (Editors) Yeast biotechnology and biocatalysis. New York: Marcel Dekker, pp. 103–46.

Cabranes C, Moreno J, Mangas JJ. 1998. Cider production with immobilized *Leuconostoc oenos*. Journal of the Institute of Brewing, 4: 127–130.

Ciani M, Maccarelli F. 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with winemaking. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14:199–203.

Ciani M, Ferraro L. 1998. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. Journal of Applied Microbiology, 85:247–54.

Ciani M, Ferraro L, Fatichenti F. 2000. Influence of glycerol production on the aerobic and anaerobic growth of the wine yeast *Candida stellata*. Enzyme and Microbial Technology, 27:698–703.

Clemente-Jimenez JM, Mingorance-Carzola L, Martinez-Rodriguez S, Las Heras-Vazquez FJ, Rodriguez-Vico F. 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. Food Microbiology, 21:149–155.

Dequin S, Salmon JM, Nguyen HV. 2003. Wine yeasts. In: Boekhout, T. and Robert, V (Editors) Yeasts in Food–Beneficial and Detrimental Aspects. Behr's Verlag, Hamburg, Germany, pp. 389–412.

Dickinson JR, Norte V. 1993. A study of branched-chain amino acids aminotransferase and isolation of mutations affecting the catabolism of branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters, 326:29–32.

Dickinson JR, Lanterman MM, Danner DJ, Pearson BM, Sanz P, Harrison SJ, Hewlins MJE. 1997. A 13C Nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 272: 26871–26878.

Downing DL. 1988. Apple Cider. In: Processed Apple Products. Donald, L.D (Editor) Van Nostrand Reinhold Pub., New York, USA.

El-Nemra SE, Ismaila IA, Askar A. 1988. Aroma changes in mango juice during processing and storage. Food Chemistry, 30(4): 269–275.
Fleet GH, Lafon-Lafourcade S, Ribereau-Gayon P. 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. Applied and Environmental Microbiology, 48:1034–1038.
Fiechter A, Fuhrmann GF, Kappeli O. 1981. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. Advances in Microbial Physiology, 22:123–183.
Hammond JRM. 1993. Brewer's yeasts. In: Rose, A.H. and Harrison, J.S (Editors) The Yeast. Yeast Technology (vol. 5). Academic Press, London, 620 pp.
Henschke PA, Jiranek V. 1993. Yeasts-metabolism of nitrogen compounds. In: Fleet, G.H (Editors) Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pensilvania, USA, pp. 77–164.
Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. Microbiology and Molecular Biology Review, 66: 300–372.
Jarvis B, Forster MJ, Kinsella WP. 1995. Factors affecting the development of cider flavour. Journal of Applied Bacteriology, 79:5S–18S.
Jolly NP, Augustyn OPH, Pretorius IS. 2003. The occurrence of non-*Saccharomyces* species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. South African Journal of Enology and Viticulture, 24:35–42.
Kappeli O. 1986. Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. Advances in Microbial Physiology, 28:181–209.
Magyar I, Tóth T. 2011. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata, Candida zemplinina, Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiology, 28:94–100.
Meilgaard M, Civille GV, Carr BT. 1999. Sensory evaluation techniques. Chapter III (3rd edition). CRC Press, Boca Raton, New York, USA, pp. 22–35.
Nieuwoudt HH, Prior BA, Pretorius IS, Bauer FF. 2002. Glycerol in South African table wines: an assessment of its relationship to wine quality. South African Journal of Enology and Viticulture, 23:22–30.
Nordstrom K. 1962. Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast. III. Participation of coenzyme A. Journal of the Institute of Brewing, 68: 398–407.
Nykanen L, Nykanen I. 1977. Production of esters by different yeast strains in sugar fermentations. Journal of the Institute of Brewing, 83:30–31.
Ortega C, Lopez R, Cacho J, Ferreira V. 2001. Fast analysis of important wine volatile compounds: Development and validation of a new method based on gas chromatography-flame ionization detection analysis of dichloromethane micro extracts. Journal of Chromatography A, 923:205–214.
Picinelli A, Suarez B, Moreno J, Rodríguez R, Caso-García LM, Mangas JJ. 2000. Chemical characterization of Asturian cider. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48:3997–4002.
Prior BA, Toh TH, Jolly N, Baccari C, Mortimer RK. 2000. Impact of yeast breeding for elevated glycerol production on fermentation activity and metabolite formation in Chardonnay. South African Journal of Enology and Viticulture, 21:92–99.
Rapp A, Mandery H. 1986. New progress in wine and wine research. Experientia, 42(8):873–884.
Ribereau-Gayon P. 1978. Wine aroma. In: Charalambous, G. and Inglett, G.E (Editors) Flavour of Foods and Beverages. Academic Press, NewYork, USA, pp. 362–371.
Ribereau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B, Lonvaud A. 2000. Biochemistry of alcoholic fermentation and metabolic pathways of wine yeasts. In: Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications. John Wiley and Sons, New York, USA, pp. 51–74.
Ribereau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B. 2006. Biochemistry of alcoholic fermentation and metabolic pathways of wine yeasts. In: Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications. John Wiley and Sons, Ltd. The Atrium, Southern Gate, Chichester, England, pp. 74–77.
Rodicio R, Heinisch JJ. 2009. Sugar Metabolism by Saccharomyces and non-Saccharomyces Yeasts. In: Biology of microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Helmut König, H., Unden, G. and Fröhlich, J. (Editors). pp. 113–134. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
Rous CV, Snow R, Kunkee RE. 1983. Reduction of higher alcohols by fermentation with a leucine-auxotrophic mutant of wine yeast. Journal of the Institute of Brewing, 89(4):274–278.
Sahoo DK, Agarwal GP. 2002. Effect of oxygen transfer on glycerol biosynthesis by an osmophilic yeast *Candida magnoliae* I_2B. Biotechnology and Bioengineering, 78(5):545–555.

Souci SW, Fachmann W, Kraut H. 2000. Juices from fruits and berries: Food composition and nutrition tables (6th edition). Scientific publishers, Stuttgart, Germany, pp. 13–52.
Su SK, Wiley RC. 1998. Changes in apple juice flavor compounds during processing. Journal of Food Science, 63(4):688–691.
Suarez-Valles B, Pando-Bedrinana R, Fernandez-Tascon N, Gonzales-Garcia A, Rodriguez-Madrera R. 2005. Analytical differentiation of cider inoculated with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) isolated from Asturian (Spain) apple juice. LWT-Food Science and Technology, 38:455–461.
Suomalainen H. 1981. Yeast esterase and aroma esters in alcoholic beverages. Journal of the Institute of Brewing, 87: 296–300.
Swiegers JH, Pretorius IS. 2005. Yeast modulation of wine flavour. Advances in Applied Microbiology, 57: 131–175.
Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA, Pretorius IS. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Australian Journal of Grape Wine Research, 11:139–173.
van Dijken JP, Scheffers WA. 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. FEMS Microbiology Reviews, 32:199–224.
Verduyn C. 1991. Physiology of yeasts in relation to biomass yields. Antonie van Leeuwenhoek, 60:325–353.
Wang L, Xu Y, Zhao G, Li J. 2004. Rapid analysis of flavor volatiles in apple wine using Headspace Solid-Phase microextraction. Journal of the Institute of Brewing, 110(1):57–65.
Wiebe MG, Rintala E, Tamminen A, et al. 2008. Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic, oxygen-limited and fully aerobic steady-state conditions and following a shift to anaerobic conditions. FEMS Yeast Research, 8:140–154.

AGRADECIMIENTOS
Los autores agradecen a la Colección de Levaduras del Instituto de Investigación de Viticultura y Enología, Bratislava, República Eslovaca, por suministrar la cepa de levadura estudiada.

Glucose Avaliation as Organic Carbon Source for *Chlorella minutissima* Biomass Production

Ferreira S.P.[1], Lisboa C.R.[1], Holz J.C.P.[1], Furlong V.B. [1], Costa J.A.V.[1]

1. FURG – Universidade Federal do Rio Grande

Resumen: El creciente interés en el estudio de cultivo de microalgas se ha orientado a la obtención de compuestos bioactivos y fármacos con alto valor de mercado en todo el mundo. El cultivo heterotrófico de las microalgas emplea compuestos orgánicos que, en ausencia de luz, utiliza el carbono orgánico como fuente de energía para la producción de biomasa. Este tipo de cultivo ofrece ventajas tales como la eliminación de la necesidad de control de la luz en el cultivo y el bajo costo para la recuperación de la biomasa, debido a la alta densidad de células obtenida. El objetivo del trabajo fue evaluar el uso de la glucosa como fuente de carbono en el cultivo heterotrófico de *Chlorella minutissima* en diferentes medios de cultivo para la producción de biomasa. Los cultivos que adicióonados com glucosa fueron los que presentaron multiplicación celular. La máxima concentración celular (1.14 $g.L^{-1}$) y la máxima productividad (0.26 $g.L^{-1}.d^{-1}$) se obtuvieron en el cultivo con medio BG11 con 10 $g.L^{-1}$ de glucosa. Sin embargo, la tasa máxima de crecimiento específico (0.28 $1.d^{-1}$) se obtuvo en el cultivo com medio Basal con 10 $g.L^{-1}$ de glucosa.

Palabras clave: Biomasa, cultivo heterotrófico, microalga.

Abstract: A growing interest is rendered to microalgae in order to scale up biomass production processes to enable the attainment of high commercial value bioactive and medicinal compounds that may be utilized in functional foods design as results of its nutritional and pharmaceutical properties. Heterotrophic microalgae culture employs organic compounds, without light utilization, as energy source for the biomass production. As such source carbohydrates are widely used, especially glucose, however, other carbon sources may be utilized, such as glycerol, acetate and others. This kind of culture offers advantages, as light necessity elimination, broader culture control, low cost biomass downstream, due to higher cell concentration when compared with autotrophic cultivation. This work objective was to validate glucose utilization as carbon source in *Chlorella minutissima* heterotrophic culture under different culture media for biomass production. The cultures that had glucose addition were the ones that presented cellular multiplication. Maximum cellular concentration (1.14 $g.L^{-1}$) and maximum productivity (0.26 $g.L^{-1}.d^{-1}$) were obtained by the culture in BG11 medium with 10 $g.L^{-1}$ of glucose. However, maximum specific growth rate (0.28 $1.d^{-1}$) was obtained by the culture in Basal medium with 10 $g.L^{-1}$ of glucose.

Keywords: Biomass, heterotrophic culture, microalga.

INTRODUCTION

The increasing interest in microalgae culture parameter studies are aimed to improve biomass production. This production is utilized in the elaboration of food products, as well as in the bioactive and medicinal compounds obtainment. These products are usually of high value in the world market. Their utilization is specially interesting in the development of functional food products, due to its nutritional and pharmaceutical properties (Borowitzka 1999, Molina-Grima *et al.* 2003).

From microalgae biomass driven cultures several compounds may be extracted. The first product is the biomass itself. Microalgae biomass usual composition is rich in high biological value proteins, carbohydrates and fatty-acids. Other compounds inherent to microalgae biomass are natural dyes, antioxidants, enzymes, biopolymers and other special products. These substances are extracted from large scale cultures. Such cultures are conducted in biorefineries (Junior 2007).

The denomination microalgae includes organisms with two cellular structures, prokaryotic and eukaryotic. The prokaryotic structure has species in the divisions *Cyanophyta* (cyanobacteria) and *Procholorophyta*. As for the eukaryotic structure, it has species in the divisions *Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xantophyceae* etc.), *Cryptophyta and Dinophyta* (Derner *et al.* 2006).

Chorella is an eukaryotic unicellular spherical microalgae. Its diameter varies between species among 5 µm an 10 µm (Illman *et al.* 2000). *Chorella* belongs to the *Chlorophyta* division and *Chlorococcales* order. Its

usual composition has a protein content of 53%, carbohydrates content of 23%, 9% lipids content and 5% mineral content (Henrikson 1994). Some species of *Chlorella* have the capacity of growing in photoautotrophic environments, as well as heterotrophic condition. A specie capable of such behavior is *Chlorella protothecoides* (Wu *et al.* 1994).

Chlorella minutissima is a green algae, microscopic and usually found in fresh water systems. This species is characterized as having a rigid cellular wall, as well as a large amount of chlorophyll. *C. minutissima* chlorophyll content is larger than other superior algae (Morais 2006). Economical interest in its culture has been growing due to a series of characteristics. Such characteristics are, relatively easy culture, high protein content, capable of achieving up to 65% of its dry weight, varying according to the culture conditions (Venkataraman and Becker 1985).

Microalgae autotrophic culture is conducted by utilizing carbon dioxide as carbon source, and sun light as energy provider. The energy is necessary to establish a proton gradient capable of turning inorganic into organic carbon trough a series of reactions. However, some microalgae species also have the ability of growing under mixotrophic conditions. In this system, two carbon sources are utilized simultaneously. Both carbon dioxide and an organic carbon source are utilized, as well as sun light as a proton gradient generator (Chojnacka and Marquez-Rocha 2004).

In the microalgae heterotrophic cultures, such as those with organic carbon sources, carbohydrates are the most utilized group (Cid *et al.* 1992), specially glucose (Miao and Wu 2006, Xu *et al.* 2006, Liang *et al.* 2009, Heredia-Arroyo *et al.* 2010, Shen *et al.* 2010, O'Grady and Morgan 2011). However, other organic carbon sources may be utilized, such as glycerol (Liang *et al.* 2009, O'Grady and Morgan 2011), acetate (Liang *et al.* 2009, Heredia-Arroyo *et al.* 2010), among others. When compared with the autotrophic culture, this sort of culture provides several advantages, such as, the elimination of light requirement, a simpler culture control and, biomass downstream coast reduction, due to the larger cellular density obtained (Chen and Johns 1991).

D-glucose is a carbohydrate (molecule which posses a carbon atom together with hydrogen and oxygen atoms, in the same proportion as they occur in water molecules) and it is the most abundant organic compound. This molecule is characterized as a monosaccharide. Glucose is also considered to be an polyol and an aldehyde. When D-glucose is represented in its open chain or vertical form, know as its alicyclic structure, it has an aldehyde group in one extremity (carbon atom 1), and a primary hydroxyl group in the other extremity (carbon atom 6). Secondary hydroxyl groups are connected to the inner carbon atoms, they are 2, 3, 4 and 5, all of which have four different substituents, making them all chiral (Damodaran *et al.* 2010).

This work objective was to evaluate glucose utilization as a carbon source in heterotrofic culture of the microalgae *Chlorella minutissima* in different culture media for biomass production.

MATERIAL AND METHODS

Microorganism and culture media

In this study the microalga *Chlorella minutissima* was utilized. This species belongs to the collection of the Laboratory of Biochemical Engineering from the Federal University of Rio Grande – FURG (Rio Grande, Brazil). The microalga was cultivated in BG11 medium (Rippka *et al.* 1979) containing ($g.L^{-1}$): $NaNO_3$ 1.50; $K_2HPO_4.3H_2O$: 0.04; $MgSO_4.7H_2O$: 0.075; $CaCl_2.2H_2O$: 0.036; Ferric ammonium citrate: 0.006; Disodic EDTA: 0.001; Na_2CO_3 0.02; Citric Acid: 0.006; H_3BO_3 2.86; $MnCl_2.4H_2O$: 1.81; $ZnSO_4.7H_2O$: 0.222; $Na_2MoO_4.2H_2O$: 0.39; $CuSO_4.5H_2O$: 0.079; $Co(NO_3)_2.6H_2O$: 0.0494; and in Basal medium (Wu *et al.* 1992) containing ($g.L^{-1}$): KH_2PO_4: 0.7; K_2HPO_4: 0.3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.3; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.003; glycine: 0.1; B1 vitamin: 0.00001 and of 1 $mL.L^{-1}$ A5 mineral solution.

Culture conditions

Heterotrophic cultures of *Chlorella minutissima* microalga were realized. The microalga was cultivated in BG11 and Basal media complemented with 0, 5 and 10 $g.L^{-1}$ of glucose in a feed batch process. The glucose addition to the cultures was realized daily with one tenth of its final glucose concentration being added (5 and 10 $g.L^{-1}$). The experiments, as well as the glucose addition, lasted for 10 days. The cultures were carried in orbital shakers (INNOVA®44) at 150 RPM and 30°C. The utilized reactor was a closed bioreactor (2L erlenmeyer) with 1.6L of solution. The initial cellular concentration was 0.15 $g.L^{-1}$. Each glucose final concentration generated an experiment; these were realized in duplicates, totaling 12 essays. At the end of each experiment the solution was centrifuged. The precipitate was then dried at 40°C for 60h and ground.

Analytical determinations

Biomass growth was monitored daily through the media optical density at 670 nm in spectrophotometer (Femto 700 Plus, Brazil) correlated by a previously established standard curve. The standard curve correlates the optical density of the media with the biomass dry weight in that solution. The kinetic evaluated parameters were the maximum biomass concentration ($X_{máx}$, $g.L^{-1}$), maximum productivity ($P_{máx}$, $g.L^{-1}.d^{-1}$) obtained according to the equation $P = (X_t\ X_0)/(t\ t_0)$, where X_t is a biomass concentration ($g.L^{-1}$) in a given time point (d), and X_0 the biomass concentration ($g.L^{-1}$) in the experiment's beginning(d) (Schmidell *et al.* 2001), and maximum specific growth rate ($\mu_{máx}$, $1.d^{-1}$), this was obtained by exponential regression applied to the exponential growth phase (Bailey e Ollis 1986).

The culture pH was determined daily by digital pH meter (Quimis Q400HM, Brazil).

Glucose concentration was evaluated daily with the utilization of a Glucose PAP Liquiform colorimetric enzymatic kit (Labtest, Brazil). The abosorbance reading was realized at 505 nm and the conversion to glucose by a previously established standard curve.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 presents the kinetic profiles of the microalgae *Chlorella minutissima* under the described growth conditions.

The microalgae *Chlorella minutissima* reached its maximum cellular concentration ($1.14\ g.L^{-1}$) after 10 of culture. The culture where this concentration conditions were 30ºC in standard BG 11 medium, in a heterotrophic manner, where the daily addition of glucose was approximately one tenth of the final concentration ($10\ g.L^{-1}$). When the microalga was cultivated with a smaller final amount of glucose ($5\ g.L^{-1}$), but with the same addition protocol, the maximum achieved cellular concentration was $0.92\ g.L^{-1}$.

Maximum productivity ($0.26\ g.L^{-1}.d^{-1}$) was reached in the essay that utilized the BG11 medium complemented with $10\ g.L^{-1}$ of glucose. Such, relative, rapid proliferation was credited to the fact that in such essay the total carbon concentration was higher than the other experiments. Thus the higher productivity achieved.

Maximum specific growth rate ($0.28\ 1.d^{-1}$) was reached when the microalga was cultivated in Basal medium, complemented with $10\ g.L^{-1}$ of glucose. This result is most likely due to the low nitrogen concentration in the medium, and the nature in which it presents itself: NO_2.

Similar results were achieved by Liang *et al.* (2009) studied and compared the growth of the microalga *Chlorella vulgaris* under different growth conditions. This species was cultivated in autotrophic and heterotrophic manners utilizing glucose, acetate and glycerol as exogenous carbon sources. It was observed that this species, under heterotrophic conditions, achieved highest cellular concentration ($1.2\ g.L^{-1}$) and highest productivity ($0.151\ g.L^{-1}.d^{-1}$) when 1% of glucose was added to the medium. However, when cultivated under mixotrophic conditions, utilizing 1% of glucose and carbon dioxide as organic and inorganic carbon sources, respectively, the biomass cellular concentration reached $1.7\ g.L^{-1}$ and productivity of $0.25\ g.L^{-1}.d^{-1}$.

Xu *et al.* (2006) cultivated the microalga *Chlorella protothecoides* in a heterotrophic fashion, in a Basal medium, under a glycine restriction (nitrogen source) and utilizing glucose and powder hydrolyzed corn as carbon sources. Under these conditions, this species reached $3.92\ g.L^{-1}$ and $3.74\ g.L^{-1}$ after 144 hours of culture when the utilized substrates were powder hydrolyzed corn and glucose, respectively.

Costa *et al.* (2006) cultivated in an autotrophic manner the cyanophytes microalgae *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* and studied their kinetic parameters. In such study, it was observed that the microalga *Chlorrella vulgaris* reached $5.06\ g.L^{-1}$ after 22 days of culture. Culture conditions were 35ºC, iluminance of 2500 Lux, $16.8\ g.L^{-1}$ of $NaHCO_3$ as carbon source and $1.0\ g.L^{-1}$ de NO_3. When the same species was cultivated under the addition of other carbon source, 1% (v/v) of carbon dioxide, it reached $2.62\ g.L^{-1}$ of cellular concentration. When cultivating *Chlorella minutissima*, the maximum cellular concentration was $1.53\ g.L^{-1}$ in the essay with 35ºC, luminance of 2500 Lux, $16.8\ g.L^{-1}$ of $NaHCO_3$ as carbon source and $0.5\ g.L^{-1}$ of NO_3. Maximum productivity for the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella minutissima* were reached in the essays which contained $16.8\ g.L^{-1}$ of $NaHCO_3$ as carbon source, with values of $0.23\ g.L^{-1}.d^{-1}$ and $0.06\ g.L^{-1}.d^{-1}$, respectively, resulting in a higher growth in the same time period. Such occurrence is correlated to the higher amount of nutrients in the medium, as well as the high temperature and luminance, all of which enhance photosynthesis activity. Maximum specific growth rate ($0.09\ 1.d^{-1}$) was reached by

Chlorella vulgaris when cultivated with $NaHCO_3$ as carbon source and 1.0 $g.L^{-1}$ of NO_3^-. For the microalga *Chlorella minutissima* the highest specific growth rate was achieved with CO_2 as carbon source and 0.5 $g.L^{-1}$ NO_3^- as nitrogen source.

Table 1: Maximum biomass concentration ($X_{máx}$, $g.L^{-1}$), maximum productivity ($P_{máx}$, $g.L^{-1}.d^{-1}$), maximum specific growth rate ($\mu_{máx,}1.d^{-1}$) obtained for the microalga *Chlorella minutissima* under different culture conditions.

Medium	Glucose Final Concentration ($g.L^{-1}$)	$X_{máx}$ ($g.L^{-1}$)	$P_{máx}$ ($g.L^{-1}.d^{-1}$)	$\mu_{máx}$ ($1.d^{-1}$)
Basal	0	0.14	0.03	0.00
	5	0.39	0.16	0.22
	10	0.38	0.20	0.28
BG11	0	0.19	0.04	0.00
	5	0.92	0.19	0.18
	10	1.14	0.26	0.22

Figure 1 presents the growth curves for *Chlorella minutissima* throughout the experiments.

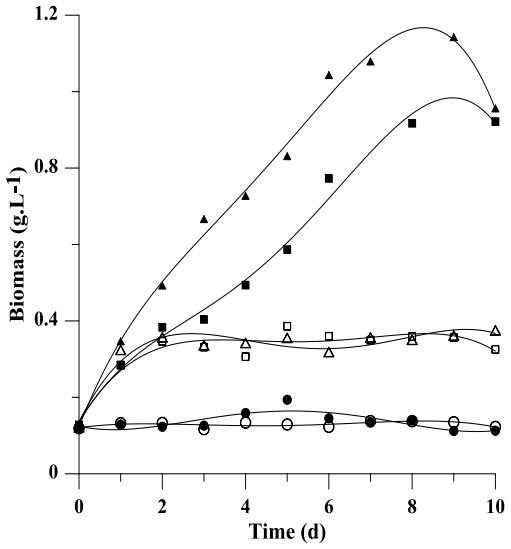


Figure 1: Growth curves to the microalga *Chlorella minutissima* cultivated in the medium BG11 and Basal, supplemented or not with glucose. Essays: (●) BG11 + 0 $g.L^{-1}$ glucose;(■) BG11 + 5$g.L^{-1}$ glucose; (▲) BG11 + 10$g.L^{-1}$ glucose; (○) Basal + 0$g.L^{-1}$ glucose; (□) Basal + 5$g.L^{-1}$ glucose; (Δ) Basal + 10$g.L^{-1}$ glucose.

Observing Figure 1, is possible to verify that the microalga *Chlorella minutissima* presented a similar behavior when cultivated with BG11 medium without the addition of glucose and with Basal medium complemented also without glucose. The experiments without glucose maintained their cellular concentration during the entire experiment, that is, these experiments did not presented growth. However, the experiments realized with the Basal medium added with glucose presented growth. Nevertheless, the exponential growth phase in the Basal experiments was relatively small. The essays with BG11 medium, added with 5 and 10 $g.L^{-1}$ of glucose showed a similar behavior among themselves, with larger exponential growth stage when compared to the other experiments.

It is observed that in the essay there was no apparent adaptation stage among the realized essays. Such behavior is due to the fact that the inoculum underwent an adaptation period to the modified media before the experiments begun. Cellular decay occurred after the 9^{th} day of culture, in the essay with BG11 medium added with 10 $g.L^{-1}$ of glucose. However, the other experiments did not presented a decrease in the cellular concentration.

Costa *et al.* (2006) when cultivating *Chlorella vulgaris* and *Chlorella minutissima* under autotrophic conditions observed that the cellular decay stage occurred after 22 days of culture under culture conditions

different to the ones here described. Furthermore, it was possible to verify that the essay with *Chlorella vulgaris* at the temperature of 35ºC, iluminance of 2500 Lux, utilizing $NaHCO_3$ as carbon source, and NO_3^- at the concentration of 1.0 $g.L^{-1}$ presented a larger exponential growth phase than the other experiments, as well as improving biomass final concentration.

Otherwise, for *Chlorella minutissima* all the essays presented similar behaviors, with brief exponential growth phase, when compared to the tests with *Chlorella vulgaris*. As oppose to what was observed with *C. vulgaris*, for the microalga *Chlorella minutissima* the utilization of carbon dioxide as carbon source increased cellular obtainment. Other research works also verified this carbon dioxide absorption efficiency. Works such as Laing (1991), which verified an increase of 2 to 5 times in cellular concentration when carbon dioxide was introduced to the cultures. Or as Ishida *et al*. (2000) in which the addition of carbon dioxide rendered a enhancement of 7 times in the productivity.

CONCLUSIONS

Chlorella minutissima biomass production was influenced by the amount of glucose add throughout the experiment to the utilized medium. The highest biomass production (1.14 $g.L^{-1}$) was reached when the microalga was cultivated in BG11 medium added with 10 $g.L^{-1}$ of glucose.

BIBLIOGRAPHY

Bailey JE, Ollis DF. 1986. Biochemical Engineering Fundamentals. 2ª ed. Singapore: McGraw-Hill. Pag. 309.

Borowitzka MA. 1999. Commercial production of microalgae: Ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of Biotechnology, 70: 313–321.

Cid A, Abalde J, Herrero C. 1992. High yield mixotrophic cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecia* (Kylin) Butcher (Prasinophyceae). Jorunal of Applied Phycology, 4: 31-37.

Chen F, Johns MR. 1991. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*. Journal of Applied Phycology, 3: 203–209.

Chojnacka K, Marquez-Rocha FJ. 2004. Kinetic and relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. Biotechnology, 1: 21-34.

Costa JAV, Radmann EM, Cerqueira VS, Santos GC, Calheiros MN. 2006. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. Alimentos e Nutrição, 17: 429-436.

Damadoran S, Parkin KL, Fennema OR. 2010. Química de Alimentos de Fennema. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed. Pag. 900.

Derner RB, Ohse S, Villela M, Carvalho SM, Fett R. 2006. Microalgas, produtos e aplicações. Ciência Rural, 36: 1959-1967.

Henrikson R. 1994. Microalga *Spirulina*: Superalimento del futuro. Barcelona: Ediciones S.A. Pag. 540.

Heredia-Arroyo T, Wei W, Hu B. 2010. Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 162: 1978–1995.

Illman AM, Scragg AH, Shales SW. 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when in low nitrogen médium. Enzyme and Microbial Technology, 27: 631-635.

Ishida Y, Hiragushi N, Kitaguchi H, Mitsutani A, Nagai S, Yoshimura M. 2000. A highly CO_2-tolerant diatom *Thalassiosira weissflogii* H1, enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. Fisheries Science, 66: 655-659.

Junior ATM. 2007. Algas e suas utilidades: do surgimento da vida em nosso planeta ao aquecimento global. Simpósio-Macro e microalgas. In: XXX Reunião Nordestina de Botânica. Cadernos de cultura e ciência. Universidade Regional do Cariri, Crato, julho, 2: 2.

Laing I. 1991. Cultivation of marine unicellular algae. Lab. Leafl. Direct. Fish. Res., Lowestoft, 67: 1-31.

Liang Y, Sarkany N, Cui Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. Biotechnology Letters, 31: 1043–1049.

Miao X, Wu Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresource Technology, 97: 841–846.

Molina-Grima E, Belarbi EH, Acien-Fernandez FG, Robles-Medina A, Yusuf C. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. Biotechonolgy Advances, 20: 491-515.

Morais MG. 2006. Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos por microalgas. Dissertação de Mestrado, Rio Grande, Brasil.Pag. 112.

O'Grady J, Morgan JA. 2011. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. Bioprocess and Biosystems Engineering, 34: 121–125.
Rippka R, Deruelles J, Waterbury JW, Herdman M, Stanier RG. 1979. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. Journal of General MicrobioZogy, 111: 1-61.
Schmidell W, Lima AU, Aquarone E, Borzani W. 2001. Biotecnologia Industrial, vol.2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, Pag. 122.
Shen Y, Yuan W, Pei Z, Mao E. 2010. Heterotrophic Culture of Chlorella protothecoides in Various Nitrogen Sources for Lipid Production. Applied Biochemistry and Biotechnology, 160: 1674–1684.
Wu QY, Yin S, Sheng GY, Fu JM. 1992. A comparative study of gases generated from stimulant thermal degradation of autotrophic and heterotrophic Chlorella. Progress in Natural Science (in Chinese), 3: 435–440.
Wu QY, Yin S, Sheng GY, Fu JM. 1994. New discoveries in study on hydrocarbons from thermal degradation of heterotrophically yellowing algae. Science in China Series B: Chemistry, 37: 326–335.
Venkataraman LV, Becker EW. 1985. Biotechnology & utilization of algae- The Indian experience. Central Food Technological Research Institute, Mysore, India. Pag. 257.
Xu H, Miao XL, Wu QY. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. Journal of Biotechnology, 126: 499–507.

ACKNOWLEDGMENT
The Nanofotobiotec Network – Integrating Network of Microalgae Nanotechnology and Biotechnology for the Development Scientific/Technological and Human Resources, for the financial support.

pH Influence in Microalga *Chlorella vulgaris* Culture

Ferreira S.P.[1], Lisboa C.R.[1], Holz J.C.P. [1], Furlong V.B.[1], Costa J.A.V.[1]

1. FURG - Universidade Federal do Rio Grande - FURG
shanaferreira@gmail.com

Resumen: El cultivo de microalgas está creciendo poco a poco en todo el mundo. La biomasa producida se destina para las más diversas aplicaciones, como la producción de proteína monocelular, lípidos, carotenoides, clorofila, enzimas, antibióticos y vitaminas. Como otros microorganismos, las microalgas reaccionan a los cambios en el entorno exterior con cambios en su ambiente intracelular. El pH interfiere con todas las reacciones químicas y bioquímicas, además de interferir en conformaciones especiales de moléculas. El pH es considerado uno de los parámetros más críticos para la actividad biológica. La forma predominante de fijacion el carbono es altamente dependiente del pH. La forma bicarbonato (HCO_3^-) se ve favorecida a pH más alcalino, alcanzando más del 80% entre pH 7 y 9, mientras que las formas de CO_2 y carbonato (CO_3^{-2}) predominan por debajo o por encima de estos valores, respectivamente. El objetivo del trabajo fue estudiar la influencia del pH en el crecimiento de *Chlorella vulgaris*. El pH del medio influyó en la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris*, donde se obtuvo la máxima concentración celular (0.30 $g.L^{-1}$) en un medio a pH del medio estándar (6.8) y enriquecido con 5 $g.L^{-1}$ de glucosa.

Palabras clave: *Chlorella vulgaris*, cultivo heterotrófico, pH.

Abstract: Microalgae culture is gaining growing interest for the scientific community. The biomass produced by these cultures is intended to several applications, such as production of unicellular proteins, lipids, carotenoids, chlorophyll, enzymes, antibiotics, and vitamins. As much as other micro-organisms, microalgae react to variations in the external environment with alterations in its cytoplasm. The pH interferes in all the internal chemical and biochemical reactions and also in special molecules conformations. pH is also regarded as the most important parameter for biological activities. The predominant carbon fixation form is also highly pH dependent, where alkaline values favour bicarbonate (HCO_3^-) formation, constituting 80% of the forms at pHs between 7 and 9, meanwhile the free CO_2 form and bicarbonate (HCO_3^-) are abundant at pH below or above this range, respectively. The objective of this work was to study the pH influence in *Chlorella vulgaris* growth. The cultures that had glucose addition were those that presented cellular multiplication. Those that did not recevied glucose did not presented growth, maintained its initial concentration (0.15 $g.L^{-1}$). The pH in influenced the *Chlorella vulgaris* biomass production, where the maximum cellular concentration (0.30 $g.L^{-1}$) was obtained in a medium at standard pH (6.8) and added with 5 $g.L^{-1}$ of glucose.

Key-words: *Chlorella vulgaris*, heterotrophic culture, pH.

INTRODUCTION

Microalgae are represented as photosynthetic prokaryotic and eukaryotic beings. They are found mostly in aquatic environments (Vonshak 1997).

In Brazil, researches with microalgae are relatively recent, and have been mostly focused in growth profiles under different environmental conditions. Such conditions may vary with culture media, specific nutrients composition in the media, culture temperature, salinity and light incidence (Derner 1995, Oliveira 1995, Sipaúba-Tavares *et al.* 1999, Costa *et al.* 2001). Microalgae culture is growing worldwide. The produced biomass may be destined to a wide variety of applications. Among such applications are unicellular protein production, lipids extraction, carotenoids, chlorophyll, enzymes downstream, esters production, antibiotics, hydrocarbons and vitamins (Pulz and Gross 2004).

Microalgae have been utilized in human feed as a high nutritional value supplement (Morais *et al.* 2006), biodyes (Silveira *et al.* 2007) and in animal feed as well (Ceballos *et al.* 2007). Furthermore, the national and international scientific community has realized a series of studies that showed their interest of utilizing the microalgae biomass as a source for the production of biofuels, such as biodiesel (through the utilization of the biomass lipid portion) (Chisti 2007). As microalgae have the capacity to fixate carbon dioxide, the biomass production system may also contribute to diminish this substance liberation into the atmosphere.

The carbon dioxide provided to the microalgae culture may be originated from different sources, such as thermoelectric power plant flue gas, thus helping to decrease greenhouse effect (Morais and Costa 2007a, Morais and Costa 2007b).
Microalgae biochemical composition varies not only with its species, but as well with its growth conditions. Such conditions variations include light intensity, temperature, pH, nutrients media composition and agitation (Miao and Wu 2004). In the example of other micro-organisms, such changes occur due to the fact that microalgae counterbalance external changes with intracellular alterations (Araujo and Garcia 2005).
pH media is one of the most important factor in the culture, varying from neutral to alkaline for most microalgae species (Ville 1967, Raven 1990). The importance of pH is related to the fact that it influences microalgae metabolism directly (Becker 1995). pH depends of a series of factors such as the media composition, buffering capacity, dissolved carbon dioxide concentration, temperature (which determinates the carbon dioxide concentration) and cellular metabolic activities (Becker *et al.* 1988). The pH variation in microalgae cultures occurs due to the consume of substrates, and metabolites production (Grima *et al*. 1999). Although pH is a physical-chemical variable, its control is essential in order to fully ensure the absorption of media compounds. Affecting directly the availability of such compounds (Lourenço 2006).
Microalgae culture involves the consumption of the dissolved carbon dioxide. This consumption increases the medium pH, eventually, to high levels (for example 9.0 – 9.5) possibly toxic to some species (Lourenço 2006). The optimum pH for *Chlorella minutissima* is pH 7. The solution pH influences in how the carbon dioxide is founded, the possible natures in which it can be found are: H_2CO_3, HCO_3^{-1} or CO_3^{-2} (Richmond 1990). The inorganic carbon, fundamental to the photosynthesis process is mostly found in pHs around 5.0. In pHs among 7 and 9 the bicarbonate fraction becomes important, as over 9.5 the carbonate is highlighted.
The specie *Chlorella vulgaris* is a unicellular microalga, mostly found in fresh water. Its class is Chlorophyceae, order Chlorococcales and family Oocystaceae (Hoek *et al.* 1995). *C. vulgaris* may be found as an unicellular being, or as a colony. Both of which have the ability to pigments such as chlorophyll, β-carotene and xanthophylls. Its main reserve structure is starch, however, under stressful situations, this species may start oil accumulation. It reproduces itself mainly by binary division, sexual spores and sexual reproduction (Hoek *et al.* 1995, Esteves 1998, Raven *et al.* 2001, Tomaselli 2004).
The microalga *Chorella* posses the GRASS (Generally Recognized As Safe) certificate emitted by the FDA (Food and Drug Administration), which grants the possibility of using such species as a food product, or part of it, without human health risk (Henrard 2009). According to Sung *et al.* (1999), *Chlorella* has a specific growth rate above pH 4.2, therefore explaining its facility in growing in tanks and lakes.
The objective of this work was to study the influence of the pH in the growth of the microalgae *Chlorella vulgaris*.

MATERIAL AND METHODS

Microorganism and culture medium

In this study the microalgae *Chlorella vulgaris* was utilized. This species belongs to the collection of the Laboratory of Biochemical Engineering from the Federal University of Rio Grande – FURG (Rio Grande, Brazil). The microalga was cultivated in Basal medium adjusted to the pHs 6.8 and 8 (Wu *et al.* 1992), containing ($g.L^{-1}$): KH_2PO_4: 0.7; K_2HPO_4: 0.3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.3; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.003; glycine: 0.1; B1 vitamin: 0.00001 and of 1 $mL.L^{-1}$ A5 mineral solution.

Culture conditions

The microalga was cultivated in a Basal medium complemented with 0, 5 and 10 $g.L^{-1}$ of glucose in a feed batch process. The glucose addition to the cultures was realized daily with one tenth of its final glucose concentration being added (5 and 10 $g.L^{-1}$). The experiments, as well as the glucose addition, lasted for 10 days. The cultures were carried out in orbital shakers (INNOVA®44) at 150 rpm and 30°C. The utilized reactor was closed bioreactor (2L erlenmeyers) with 1.6 L of solution. The initial cellular concentration was 0.15 $g.L^{-1}$. 4 experiments were realized in duplicates, where 3 were with the medium standard pH (6.8) complemented with 0; 5 e 10 $g.L^{-1}$ of glucose, and another with pH 8, complemented with 5 $g.L^{-1}$ of glucose, totaling 8 essays. At the end of each experiment the solution was centrifuged. The precipitate was then dried at 40°C for 60 h and ground.

Analytical determinations

Biomass growth was monitored daily through the media optical density at 670 nm in spectrophotometer (Femto 700 Plus, Brazil) correlated by a previously established standard curve. The standard curve correlates the optical density of the media with the biomass dry weight in that solution. The culture pH was determined daily by digital pH meter (Quimis Q400HM, Brazil).
Glucose concentration was evaluated daily with the utilization of a Glucose PAP Liquiform colorimetric enzymatic kit (Labtest, Brazil). The abosorbance reading was realized at 505 nm and the conversion to glucose by a previously established standard curve.

RESULTS AND DISCUSSION
Figure 1 presents the distinct behavior of the microalga *Chlorella vulgaris* when cultivated in Basal medium complemented or not with glucose under different pHs.

A

B

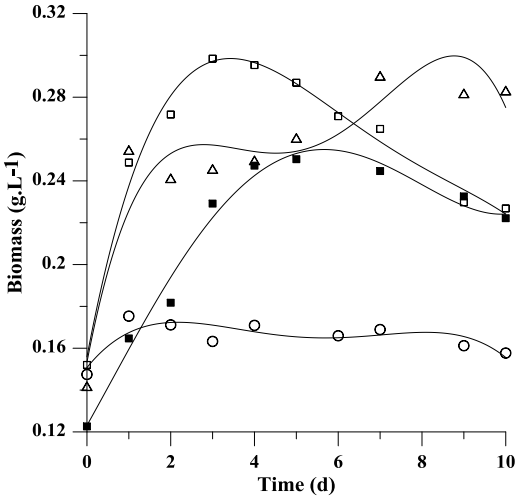


Figure 1: **A** Heterotrophic culture of *Chlorella vulgaris* in Basal medium complemented with 0; 5 and 10 g.L^{-1} of glucose under pHs 6.8 and 5 g.L^{-1} of glucose under pH 8, respectively from left to right. **B** Growth profiles of the microalgae *Chlorella vulgaris* cultivated in Basal medium, supplemented or not with glucose. Essays: (○) Basal + 0 g.L^{-1} glucose pH 6.8; (□) Basal + 5g.L^{-1} glucose pH 6.8; (Δ) Basal + 10 g.L^{-1} glucose pH 6.8; (■) Basal + 5 g.L^{-1} glucose pH 8.

Observing Figure 1 A is possible to notice the different colors between the cultures. The cultures realized with the microalgae *Chlorella vulgaris* under glucose addition (final concentrations of 5 g.L^{-1} e 10 g.L^{-1}) presented a decrease of the its usual green coloration. Such fact is correlated with a lessening of the cell pigmentation, that is, the decay of chlorophyll inside the microalgae cell.
This means that in the essays with 5 g.L^{-1} of glucose, independent of the medium pH, the culture color decayed to a light-green color, as for the essay with 10 g.L^{-1} presented a light-yellow color. However, in the essays without the glucose addition the microalga *Chlorella vulgaris* did not achieved the necessary cellular viability in order to present growth. Nevertheless, after the 10 days of culture, the microalga still presented its initial green color, denoting that there was not a large decay of chlorophyll.
According to Tel-or et al. (1980) the concentration of chlorophyll in the microalgae cells is influenced by several factors. Such as the medium composition, the cell age, as well as the process conditions. Therefore,

in autotrophic cultures (carbon dioxide + light) and mixotrophic (carbon dioxide + light + organic substrate) the light intensity and carbon dioxide levels are the most important factors.

The majority of microalgae are capable of sustaining growth under heterotrophic conditions (light absence + organic substrate), but while doing so, their chlorophyll accumulation does not reach the levels obtained by cultures utilizing a light source. According to Lourenço (2006) the heterotrophic culture of *Chorella* presented the higher productivity than mixotrophic cultures, reaching 48 $g.L^{-1}d^{-1}$. However, under such conditions, the microalga lose its pigment molecules.

Rubio *et al.* (1989) studies the amount of chlorophyll during a heterotrophic culture of *chlorella pyrenoidosa* utilizing as energy and carbon source the monosaccharides glucose, fructose and manose. These authors observed that in the first hour of culture the was a increase in the chlorophyll cellular levels. However, after 5 to 6 hours it was verified that even though the level of chlorophyll had risen, in $mol.mL^{-1}$, its weight percentage diminished gradually. Similar results for all the monosaccharides occurred. The chlorophyll decrease was more rapid as the organic substrate concentration was larger

The results presented here are congruent to the ones exposed by Rubio *et al.* (1989) and Kariander e Krausm (1966), in which it was observed that *Chlorella vulgaris* heterotrophic growth, utilizing glucose as energy and carbon source presented a decrease of chlorophyll cellular concentration after the second day of culture. While in the first day the relationship chlorophyll/cell remained constant or a small decrease occurred.

Trough the analysis of Figure 1 B is possible to verify that there was no adaptation stage, this occurred due to the fact that the inoculum were previously adapted to the essay condition. Furthermore, it is verified that the microalga did not grow when a organic carbon source was not added (glucose). This behavior is explained by the fact that there was no possibility of obtaining energy through photosynthesis, for the experiments were realized without ambient light.

It is also possible to notice that the exponential growth phase was intense in the first day of culture, extending itself to the third and fourth days of culture, in the essays complemented with 5 $g.L^{-1}$ of glucose. The microalga growth capacity was influenced by the medium pH. In pH 6.8 it was obtained a maximum biomass concentration of 0.30 $g.L^{-1}$, while in pH 8 the maximum biomass concentration was 0.25 $g.L^{-1}$. Thus confirming the pH influenced in cellular growth, and therefore, its influence in productivity. In this case, the slightly acid pH (6.8) enhanced the microalga growth. When a higher glucose concentration was utilized (10 $g.L^{-1}$) in the medium with pH 6.8, the growth profile was similar to the one with a smaller glucose concentration (5 $g.L^{-1}$), the obtained values for maximum biomass concentration were 0.29 $g.L^{-1}$ and 0.30 $g.L^{-1}$, respectively, presenting a small influenced of the added glucose concentration.

The results here presented are congruent with the ones exposed by Marinho *et al.* (2009), where it was evaluated *Chlorella vulgaris* growth under different pHs (5, 7, 9). It was verified that the largest, maximum cellular density of approximately $9500x10^4$ $cel.mL^{-1}$ was observed in the essay with pH 5 at the ninth day of culture. For the essay containing the medium adjusted to a pH 7 the maximum cellular density was $4900x10^4$ $cel.mL^{-1}$, in the sixth day of culture. In the essay containing medium with pH 9 the maximum achieved cellular concentration dropped to $4200x10^4$ $cel.mL^{-1}$, in the ninth day of culture. These results indicate that the microalga *Chlorella vulgaris* presents better growth results in low pHs. According to Esteves (1998), in a aqueous environment inorganic carbon may presents itself as CO_2, H_2CO_3 (carbonic acid), HCO_3^- (bicarbonate) or CO_3^{2-} (carbonate) and its proportion varies with the pH in which the media is. As pH rises, the proportion of carbonate and bicarbonate also rise as well. Therefore, in a culture, a lower pH enhances the proportion of carbon dioxide inside the medium, and this is the preferable form for microalgae.

Different results to pH alteration occur in other microalgae species, one specie with a different behavior is *Spirulina*. Karam and Soccol (2007) evaluated the pH influence in the production of *Spirulina major* and verified that when this microalgae was cultivated in pH 8 the final biomass concentration (1.274 $g.L^{-1}$) was higher and statistically different than the cultures with pH 7 (1.137 $g.L^{-1}$), pH 9 (1.030 $g.L^{-1}$) and pH 10 (0,9970 $g.L^{-1}$). Therefore, they have concluded that the optimum pH for this microalga is 8. However, according to Ferraz (1985) and Materassi *et al.* (1984) the optimum pH for *S. major* is between 9.0-10.0, a larger value than to other *Spirulina* species.

CONCLUSIONS

The culture pH influenced the production of *Chlorella vulgaris*. Thus, it was verified that the largest cellular concentration (0.30 $g.L^{-1}$) occurred when the microalga was cultivated in the standard Basal medium pH (6.8) complemented with 5 $g.L^{-1}$ of glucose.

BIBLIOGRAPHY

Araujo SC, Garcia, VMT. 2005. Growth biochemical composition of the *diatom Chaetoceros* cf. *wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. Aquaculture, 246: 405-412.

Becker EW. 1995. Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge University Press. Pag 292.

Becker EW. 1988. Microalgae for human and animal consumption. In: Borowitzka MA e Borowitzka LJ (Eds) Microalgal Biotechnology. Cambridge. Cambridge University Press. Pag 4.

Ceballos BJ, Cerecedo RC, Villarreal H. 2007. Use of *Spirulina platensis* meal as feed attractant in diets for shrimp Litopenaeus schmitti. Hidrobiologia, 17: 113-117.

Costa JAV, Cozza KL, Oliveira L, Magagnin G. 2001. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 17: 439-442.

Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances, 25: 294-306.

Derner RB. 1995. Crescimento da microalga Thalassiosira fluviatilis (classe Bacillariophyceae) sob diferentes regimes de iluminação, na região sul do Brasil. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Pag 108.

Esteves FA. 1998. Fundamentos de Limnologia. 2ª ed. Inteligência, Rio de Janeiro, Brasil. Pag 602.

Ferraz CAM, Aquarone E, Krauter M. 1985. Efeito da luz e do pH no crescimento de *Spirulina máxima*. Revista de Microbiologia, 16: 132-137.

Grima EM, Fernadez FGA, Camacho FG, Chisti Y. 1999. Photobioreactors: light regime, mass transfer and scale up. Journal of Biotechnology, 70: 231-247.

Henrard A.S.A. 2009. Cultivo Semicontínuo das Microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. Pag 115.

Hoek VD, Mann DG, Jahns HM. 1995. Alage: an introduction to phycology. Cambridge University Press, Cambridge, UK. Pag 623.

Karam, LM, Soccol CR. 2007. Efeito da Temperatura e pH no cultivo de *Spirulina major*. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar, 10: 5-7.

Kariander EP, Krauss RW. 1966. Responses of Heterotrophic Cultures of *Chlorella vulgaris* Beyerinck to Darkness and Light. I. Pigment and pH Changes. Plant Physiology, 41: 1-6.

Lourenço SO. 2006. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. São Carlos: RiMa. Pag. 606.

Marinho YF, Santos APF, Santos LBG, Vasconcelos RFL, Kalazans NKF, Nascimento RDM, Dantas DMM, Gálvez AO. 2009. Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris* em diferentes pH objetivando sua inserção na matéria-prima do biodiesel. In: IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, PEPEX 2009, UFRPE, Recife, 19 a 23 de outubro de 2009.

Miao X, Wu Q. 2004. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. Journal of Biotechnology, 110: 85-93.

Materassi R, Tredici M, Balloni W. 1984. *Spirulina* culture in seawater. Applied Microbiology and Biotechnology, 19: 384-386.

Morais MG, Miranda MZ, Costa JAV. 2006. Biscoitos de chocolate enriquecidos com Spirulina platensis: Características fisicoquímicas, sensoriais e digestibilidade. Alimentos e Nutrição, 17: 323-328.

Morais MG, Costa JAV. 2007a. Carbon dioxide biofixation with *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. Biotechnol Letters, 29: 1349–1352.

Morais MG, Costa JAV. 2007b. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor, Journal of Biotechnology, 129: 439-445.

Oliveira A. 1995. Crescimento das diatomáceas Bacillariophyceae Chaetoceros sp., Skeletonema costatum e Thalassiosira fluviatilis em diferentes meios de cultivo e em condições controladas de temperatura e salinidade. Dissertação de Mestrado-Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Pag 64.

Pulz O, Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology, 65: 635-648.

Raven JA. 1990. Sensing pH? Plant, Cell and Environment, 13: 721-729.

Raven PH, Evert RF, Eichhom SE. 2001. Biologia Vegetal. 6ª Ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. Pag 906.
Richmond, A. 1990. Handbook of microalgal mass culture. Boston: CRS Press. Pag 1255.
Rubio FC, Sancho MEM, Villasclaras SS. 1989. Contenido de clorofila em *Chlorella pyrenoidosa* durante El crecimiento heterotrófico sobre monosacáridos. Afinidad XLVI, 420: 151-153.
Silveira ST, Burkert JFM, Costa JAV, Burkert CAV, Kalil SJ. 2007. Optimization of phycocyanin extration from *Spirulina platensis* using factorial design. Bioresource Technology, 98: 1629-1634.
Sipaúba-Tavares LH, Pelicione LC, Oliveira A. 1999. Use of inorganic (NPK) and the Chu_{12} medium for cultivation of Ankistrodesmus gracilis in laboratory. Brazilian Journal of Ecologyl, 3: 32-37.
Sung KD, Lee JS, Shin CS, Park SC, Choi MJ. 1999. CO_2 fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics. Bioresource Technology, 68: 269-273.
Tel-or E, Boussiba S, Richmond AE. 1980. Products and Chemicals from Spirulina platensis. In: Algae Biomass, Shelef G, Soeder CJ. Elsevier/North-Holland, Biomedical Press, Amsterdam. Pag 611-618.
Tomaselli L. 2004. The microalgal cell. In: Richmond, A. (ed.). Handbook of microalgal culture: Biothecnology and applied Phycology. Blackwell Publishing, Oxford, USA, p. 3-19.
Ville C. 1967. Biología. Mexico: Editorial Interamericana S.A. Pag 688.
Vonshak A. 1997. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*). Physiology, Cell-biology and Biotechnology, London: Taylor & Francis. Pag 250.
Wu QY, Yin S, Sheng GY, FU JM. 1992. A comparative study of gases generated from stimulant thermal degradation of autotrophic and heterotrophic Chlorella. Progress in Natural Science (in Chinese), 3: 435–440.

ACKNOWLEDGMENT
The Nanofotobiotec Network – Integrating Network of Microalgae Nanotechnology and Biotechnology for the Development Scientific/Technological and Human Resources, for the financial support.

Condiciones de producción y comportamiento térmico de lactasa recombinante.

Lupi G. J, Perillo M.A.y Sanchez J.M.

IIBYT (CONICET-UNC)- ICTA, FCEFyN,UNC.
jmsanchez@efn.uncor.edu

Resumen: El objetivo del presente trabajo fue comparar la actividad de la beta-galactosidasa nativa de *Escherichia coli* (β-$Gal_{E.coli}$) con respecto a β-Gal_{His6}. Esta última es una proteína recombinante derivada de β-$Gal_{E.coli}$ con el agregado de 6 residuos de histidina (His-tag) fusionados en el extremo carboxilo terminal. Esta modificación facilitó su purificación por cromatografía de afinidad ión-metal (IMAC). La hidrólisis de lactosa catalizada por β-Gal se determinó con el método de la glucosa oxidasa por espectrofotometría visible frente condiciones variables de temperatura, pH, concentración de lactosa. Nuestros resultados mostraron que, ambas enzimas presentan un perfil de actividad similar frente a pH y temperatura. Por otro lado, la enzima recombinante presentó una leve resistencia a la inactivación por temperatura y pH con respecto a la enzima nativa. Ambas enzimas presentaron una cinética michaeliana y similar afinidad por la lactosa (K_M≅4,2 mM). Sin embargo, en todos los casos la actividad específica de β-Gal_{His6} fue menor con respecto a β-$Gal_{E.\ coli}$ sugiriendo que la presencia de histidinas podría afectar la actividad enzimática al nivel del mecanismo de reacción. Sin embargo, no se descartan posibles diferencias conformacionales entre estas dos variantes de la enzima.

Palabras claves: Lactasas recombinantes, actividad enzimática

Abstract: The aim of this study was to compare the activity against lactose of native *E.coli* beta-Galactosidase (β-Gal_{E-coli}) with a recombinant parent protein β-Gal_{His6}. β-Gal_{His6} was over-expressed in *E. coli* and contained 6 histidine residues fused to the carboxyl terminal, which facilitated its purification by metal-ion affinity chromatography, (IMAC). The hydrolysis of lactose was quantified spectrophotometrically at varying conditions of temperature, pH and lactose concentration . Both enzymes showed similar affinity for lactose (K_m ≅ 4.2 mM). The recombinant enzyme showed a slight resistance to inactivation by temperature and pH. The specific activity of β-Gal_{His6} was lower with respect to β-$Gal_{E.\ coli}$ suggesting that the presence of histidine could affect in the reaction mechanism. Furthermore, possible conformational changes cannot be discarded.

Keywords: Recombinant lactase, enzyme activity

INTRODUCCIÓN

La β-galactosidasa o β-D-galactosido-galactohidrolasa (β-Gal) es una enzima perteneciente a la familia de las glicosidasas, las cuales son capaces de disociar uniones entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y un grupo no carbohidrato (aglicona). Esta enzima ampliamente utilizada y de gran interés en la industria láctea cataliza la hidrólisis de un enlace β-galactosídico terminal presente en carbohidratos, glicolípidos, glicoproteínas y glicosaminoglicanos (Tanaka et al., 1975).

Uno de los sustratos naturales más importante es la lactosa (β-D-galactopiranosil-(1-4)- D-glucopiranosa) o azúcar de la leche la que se disocia en sus componentes monoméricos: glucosa y galactosa. El método enzimático para hidrolizar lactosa es más conveniente que el uso de ácidos y alta temperatura (150°C) donde se generan subproductos indeseables causados por la interacción de los grupos amino de las proteínas lácteas con lactosa, debido al gran poder reductor de esta última.

El principal uso de la β-Gal es la disponibilidad de sistemas inmovilizados que permiten la hidrólisis contínua de la lactosa de la leche (Mateo et al. 2002). Este tratamiento de la leche con β-Gal antes de la comercialización tiene importancia a los fines de solucionar problemas nutricionales (como la intolerancia a la lactosa) y/o tecnológicos (cristalización o azucaramiento del dulce de leche por envejecimiento). Es de gran interés también para el tratamiento de residuos de la industria láctea que contienen lactosa (como es el caso del suero de la leche, desechado en la producción de queso), debido a que este disacárido tiene una tasa de biodegradabilidad muy baja y puede producir contaminación del ambiente por bioacumulación. El alto poder edulcorante de los productos de hidrólisis de lactosa, hace que este proceso tenga un atractivo extra

debido a la posibilidad de obtener jarabes de galactosa y glucosa, utilizados en la elaboración de helados, golosinas y productos de confitería y panadería, postres, alimento de animales, y aditivos para ensilaje. Además la mezcla de glucosa y galactosa (productos de la hidrólisis de lactosa) es 2 a 3 veces más dulce que la lactosa. Esto produce un cambio perceptible y en la mayoría de los casos indeseado en el sabor del alimento. Más aún, β-Gal se utiliza para la eliminación de azúcares de jugos de frutas (Brenchley, 1996), la producción de nuevos derivados de azúcares, galacto-oligosacáridos (GOS) a partir de transglicosilaciones con diferentes donores (Sheridan y Brenchley, 2000). Estos últimos, son considerados suplementos alimenticios (o sustancias prebióticas) no digeribles y actúan como fibras en la dieta promoviendo el crecimiento de bífido bacterias (probióticos) en el intestino que mejoran sensiblemente el funcionamiento orgánico ya que modifican positivamente la flora intestinal y favorecen el funcionamiento del sistema inmune y, por tanto, la salud global del organismo (Sako et al, 1999).

Además, de los usos tecnológicos, también existe la posibilidad de utilizar β-Gal con fines terapéuticos en las terapias de sustitución enzimática para el tratamiento de la hipolactasia. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha logrado la incorporación de β-Gal encapsulada en liposomas para ser incorporados a la leche utilizada en la alimentación de personas intolerantes a la lactosa. Esto podría presentar algunas ventajas, respecto al consumo de leche deslactosada principalmente en cuanto a la preservación de los caracteres organolépticos de la leche (Turina,et al, 2002).

Por todo esto, es importante disponer de esta enzima en grandes cantidades. En consecuencia, uno de los objetivos del presente trabajo, fue establecer las condiciones óptimas para la transformación de bacterias (E.coli) con el gen de que codifica para una β-Gal recombinante (β-Gal_{His6},) que contiene 6 residuos de histidina (His) unidos al carboxilo terminal de cada uno de los 4 monómeros que conforman la estructura de la proteína.

Esto no sólo permite disponer de una fuente de producción de enzima en grandes cantidades sino que también facilita la purificación de la misma aprovechando la propiedad que le confiere la cola de poli-His de unirse selectivamente a una columna de afinidad (Sánchez et al., 2009).

Además, se han reportado resultados que demuestran que la presencia de histidinas adicionales en la estructura primaria de enzimas en algunos casos puede afectar su actividad catalítica (Cadel et al, 2004) y en otros casos puede ser inocua (Mateo et al., 2006). Además, nosotros hemos demostrado que la enzima recombinante interactúa de manera diferente con interfases lipídicas con respecto a la enzima nativa (Sanchez, et al., 2009) y por lo tanto se sugiere que es posible encontrar características funcionales diferentes en la enzima recombinante β-Gal_{His6}. En consecuencia, otro objetivo del presente trabajo fue estudiar el comportamiento bioquímico de β-Gal_{His6} de manera comparativa con el de la β-$Gal_{E.coli}$ nativa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales.

Actividad de β-Gal: La enzima β-galactosidasa [EC 3.2.1.23] Grado VII de *E. coli*, en forma de polvo liofilizado (en presencia de sales de buffer Tris/HCl, $MgCl_2$ y β-mercaptoetanol) nativa de origen comercial adquirida en Sigma Chem. Co. (β-$Gal_{E.coli}$). La enzima β-galactosidasa recombinante (β-Gal_{Hist6}), producida en nuestro laboratorio a partir de una cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pET26+.

Reactivo Glicemia enzimática AA líquida utilizado para medir la concentración de Glucosa. Lactosa monohidratada utilizada como sustrato (Anedra) y el o-nitrophenyl-β-D-galactopiranósido (ONPG) adquirido en Sigma Chem. Co., otros reactivos de grado analítico, Purificación de proteínas: Medio de cultivo LB: Triptona (Britania), Extracto de levadura (Britania), NaCl (Anedra), Kanamicina (Cristalomicina Inyectable), Agar (Britania). Inductor: isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) (UltrapureTM 99% de pureza Invitrogen). Cromatografía de afinidad: Resina (ProBondTM Resin). Elución de proteína: Imidazol (Biopack) Cepas de *E. coli* BL2 1λpri-Codon plus: catalogadas como seguras por la FDA (Food and Drugs Admininstration, USA)

Métodos

Producción y purificación de β-galactosidasa recombinantes.

Bacterias *E. coli* de la cepa BL2 1λpri-Codon plus, previamente transformadas fueron incubadas en 500 mL de medio de cultivo Luria Bertani (LB) en presencia del antibiótico kanamicina (20 μg/mL), con el fin de seleccionar las bacterias que tuvieran inserto el plásmido pET26(+). Este plásmido posee en su secuencia el gen de resistencia a la kanamicina además del gen de β-Gal. El cultivo se agitó durante toda la noche (O.N.) a 37 °C. Luego se tomaron 6 mL del mismo y se centrifugó a 4000 rpm, por 10 min. a 4°C. Se descartó el

sobrenadante y se resuspendió el pellet en 600 mL de medio de cultivo LB en presencia de kanamicina (20 ug/ml). Se dejó crecer a 37 °C durante ~3 h, con agitación, hasta alcanzar una densidad óptica (DO) entre 0,4 y 1,0. Una vez lograda la DO deseada se agregó IPTG (0,4 mM) para inducir la expresión de la enzima y el cultivo se mantuvo con agitación O.N. a 20°C. Posteriormente las células se cosecharon por centrifugación, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 20 mL de buffer fosfato 0,05 M y NaCl 1mM pH 6,8. Luego las células fueron lisadas por tres ciclos consecutivos de sonicación (en un sonicador de punta de alta frecuencia Marca: Biologics INc. (Mod 150 V/T)), congelación (aire líquido -196°C) y descongelación (baño termostatizado a 30°C).
El lisado celular obtenido se mezcló con la resina conteniendo iones de Ni, con afinidad para la unión a residuos de histidina; se dejó interactuar durante 2 h a 4ºC con agitación y posteriormente se realizaron lavados con soluciones de imidazol de concentración creciente desde 60, 100, 200 mM; finalmente la resina interactuó durante 15min. con una solución de imidazol 400 mM y luego se dejó eluir la solución. El imidazol se eliminó por diálisis contra buffer fosfato 0,05 M pH 6,8 usando membranas de diálisis y el dialisado se liofilizó (-90°C y vacío) para obtener la enzima en forma de polvo.
La expresión y la pureza de las proteínas fueron determinadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

***Determinación de la concentración de enzima*.**
La concentración de β-Gal se determinó por el método de Lowry (1951).

***Hidrólisis de lactosa*.**
La actividad de β-Gal se determinó por el método de Huber y sus colaboradores (1976). El
medio de reacción contuvo 20 μL enzima (entre 0,1 y 0,2 mg/L) y 80 μL lactosa (250 mM, ambos reactivos se disolvieron en buffer fosfato 0,05 M pH 6,8, la reacción se mantuvo a 37°C durante 20 min. y la reacción se detuvo calentando el sistema de incubación a 100ºC durante 5 min, para desnaturalizar e inactivar la proteína. Uno de los productos de hidrólisis (glucosa) se cuantificó por el método de glucosa oxidasa (Raba y Mottola, 1995)

Efecto de temperatura y pH y tiempo sobre la actividad enzimática
Para medir el efecto de la temperatura la reacción se llevó a cabo en un rango de 22 a 66 ºC a pH 6,8. El efecto del pH se analizó midiendo la actividad de cada una de las enzimas estudiadas en un rango de 3 a 9 logrado por buffer citrato (3,00 a 6,21), fosfato (5,83 a 8,13) y Tris/HCl (7,53 a 9,00) a 37ºC, (Tris = tris(hidroximetil)aminometano). El efecto del tiempo de reacción (entre 10 y 330 min,) se analizó a 37ºC y buffer pH 6,8, en tubos tapados con tapones de goma, para evitar la evaporación de agua.

***Determinación de los parámetros cinéticos*:**
Los parámetros cinéticos K_M y Vmax se determinaron a partir del ajuste de la ecuación de Michaelis Menten, por el método de mínimos cuadrados, a las curvas de velocidad inicial en función de la concentración de lactosa en un rango de 0,5 a 250 mM..

Estudios de reversibilidad de la actividad enzimática
Se realizaron estudios de reversibilidad de la actividad preincubando cada enzima durante 30 min. a distintas temperaturas o distintos pH y luego se midió la actividad en condiciones óptimas (37ªC, pH 6,8).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Purificación de β-Gal$_{His6}$.
Para determinar las condiciones de sobreexpresión de β-galactosidasa se probaron 2 variables en el tratamiento del cultivo de la bacteria, la densidad óptica (DO) (0,45 y 1,00) y la concentración de inductor (IPTG) (0,4 mM y 1,0 mM). Los resultados se muestran en la Fig. 1.

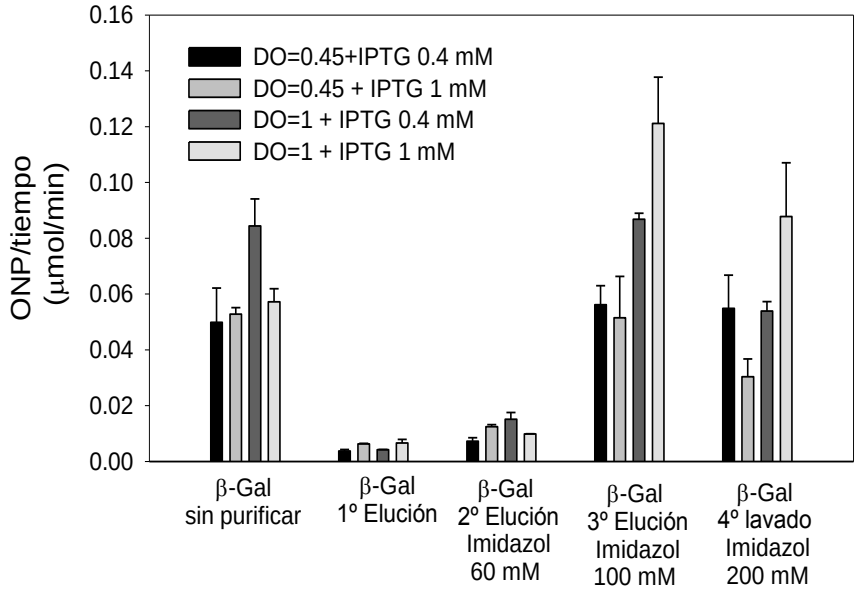


Figura 1. Actividad enzimática de β-Gal proveniente de sucesivas etapas de purificación (indicadas en la figura). La muestra de β-Gal sin purificar corresponde a la solución previo a la incubación con la resina. La muestra β-Gal 1° elución corresponde a la solución luego de ser incubada con la resina y antes de comenzar a eluir con imidazol. Se indica la actividad enzimática de muestras lavadas con soluciones de imidazol a las concentraciones indicadas en el gráfico.

La mayor actividad se observó en las muestras lavadas con 100 mM de imidazol y cuando los valores de DO y concentración de IPTG correspondieron a 1,00 y 1,0 mM respectivamente (condición 4º). A pesar de esto, la condición de cultivo que presentó mayor eficiencia fue DO = 1,00, y concentración de IPTG = 0,4 mM (condición 3º). El uso de una concentración de más del doble de IPTG (condición 4º respecto de condición 3º) indujo un aumento en la actividad de la enzima de sólo un 30%. Esto podría deberse a que el exceso de IPTG puede tener un efecto negativo en la expresión de proteínas ya que estas proteína recombinantes a determinada concentración podrían ser tóxicas para la bacteria (Corona et al., 2007). Por otro lado, la sobreexpresión de proteínas en *E. coli* ocurre habitualmente bajo la forma de cuerpos de inclusión. Estos requieren un tratamiento adecuado y costoso para obtener la proteína soluble (Alibolandi et al. 2009).
Por esto fue la condición 3º, la seleccionada como más apropiada para posteriores. purificaciones. Con soluciones de proteínas provenientes de esta condición de purificación DO = 1,00 y IPTG = 0,4mM se realizó la electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida para determinar el grado de pureza alcanzado. Esta se muestra en la Fig. 2.

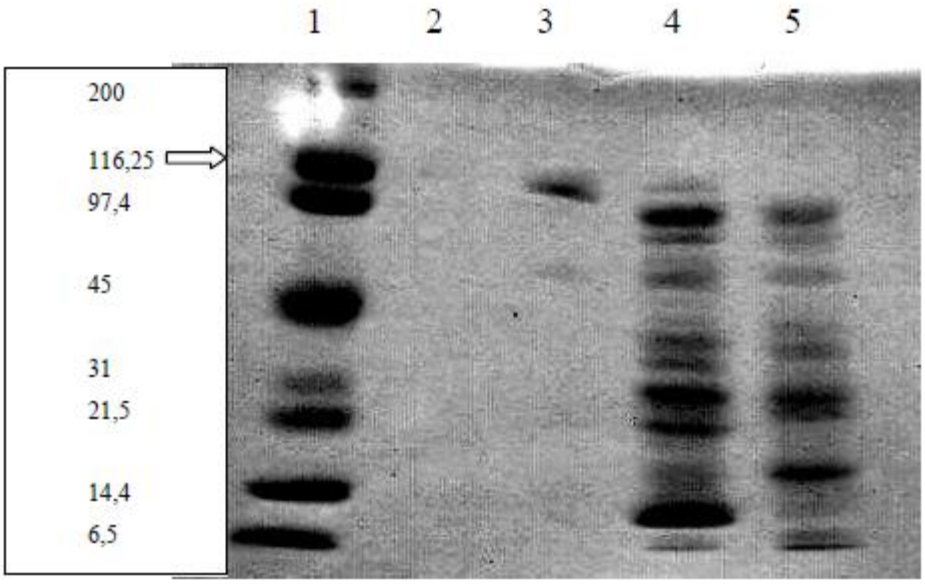


Figura 2. Electroforesis SDS-PAGE de las muestras provenientes en las sucesivas etapas de purificación. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: elución con imidazol 400 mM. Carril 3: elución con imidazol 100 mM. Carril 4: elución con imidazol 60 mM. Carril 5: elución sin imidazol. Marcadores de referencia: 200 miosina; 116,25 β-galactosidasa; 97,4 fosforilasa b; 45 ovalbumina; 31 anhidrasa carbónica; 21,5 inhibidor de tripsina de la soja; 14,4 lisozima; 6,5 aprotinina.

Se observó un alto grado de pureza en la elución, que se realizó con la solución de imidazol de concentración 100 mM. Carril 3 de la Fig. 2.
Se realizó una nueva electroforesis, para determinar y comparar el grado de pureza de cada una de las soluciones enzimas (β-Gal$_{Hist6}$ y β-Gal$_{E.coli}$) que fueron utilizadas para la determinación de la actividad enzimática en cada uno de los experimentos.

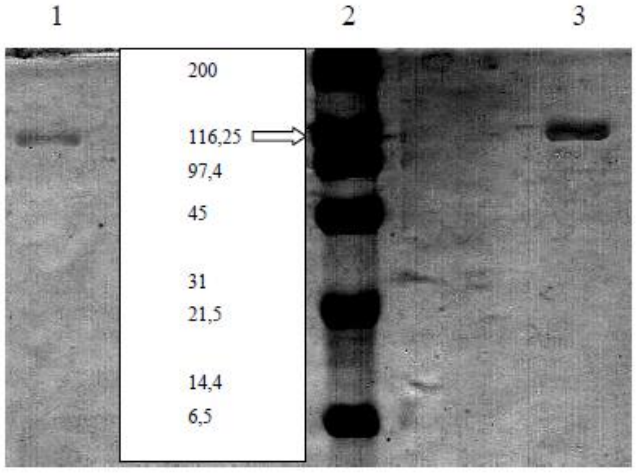


Figura. 3 Electroforesis SDS-PAGE de la muestras conteniendo beta galactosidasa nativa y recombinante.. La flecha indica el peso molecular del monómero de β -galactosidasa (116 kD). Carril 1: β-GalE$_{. coli}$. Carril 2: Marcador de peso molecular. Carril 3: β-Gal$_{His6}$ (elución con imidazol 100 mM). Se observó que ambas enzimas se encuentran en un alto nivel de pureza. Marcadores de referencias: 200 miosina; 116,25 β-galactosidasa; 97,4 fosforilasa b; 45 ovalbumina; 31 anhidrasa carbónica; 21,5 inhibidor de tripsina de la soja; 14,4 lisozima; 6,5 aprotinina.

Esta electroforesis sugirió que ambas soluciones de β-Gal se encontraron libres de otras proteínas. Este dato fue muy significativo a la hora de determinar la concentración de enzima de las soluciones, para lo cual se utilizó el método de Lowry (Sección 2.2.3).

Comparación de las actividades catalíticas de β-Gal$_{His6}$ y β-Gal$_{E.coli}$

Efecto de la temperatura.

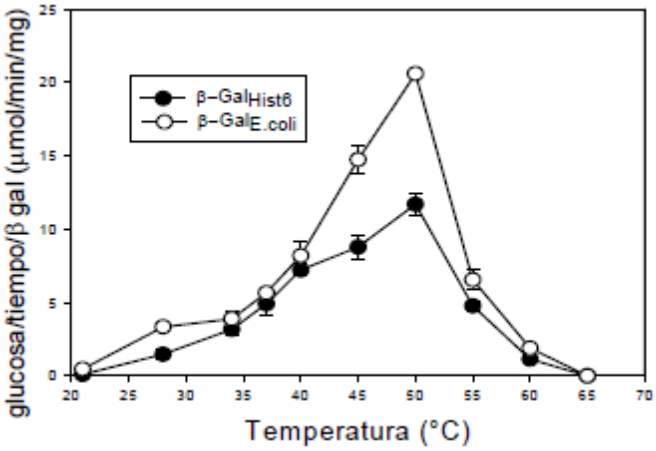


Figura. 4 Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad de β -Gal. Rango 22 a 66°C. Puntos blancos: β-Gal$_{E.coli,}$ Puntos negros: β-Gal$_{His6}$.

La enzima recombinante presentó menor actividad catalítica en todo el rango de temperatura estudiado, sin embargo presentó mayor tolerancia al cambio de temperatura con respecto a la enzima nativa entre 37 y 50ºC. Para ambas enzimas la actividad fue muy baja a temperaturas menores de 30°C, pero comenzó a aumentar inmediatamente después de este valor, y fue máxima a 50°C. Cuando se superaron estos máximos, la actividad específica disminuyó, de manera abrupta. Después de los 60°C ambas enzimas experimentaron una actividad muy pequeña que desapareció totalmente a 66°C.

Efecto del pH

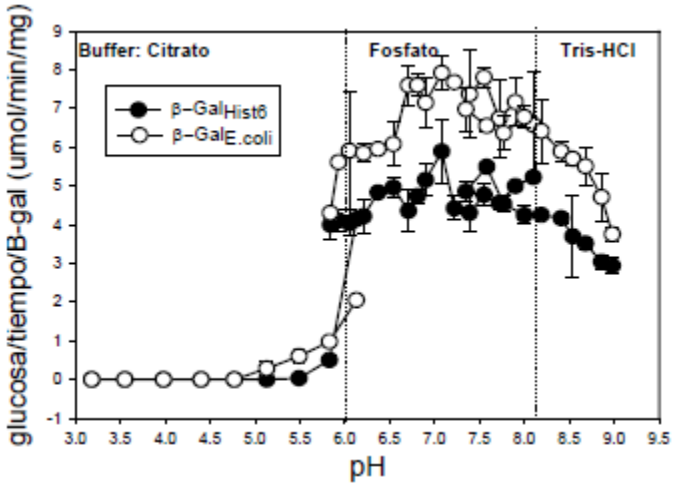


Figura. 5. Efecto de pH de incubación sobre la actividad de β -Gal. . Rango 3 a 9, buffers utilizados; ácido cítrico/citrato de sodio (rango de pH 3,04 a 6,21), fosfato monobásico de sodio/fosfato dibásico de sodio (rango de pH 5,90 y 8,18) y tris/ácido clorhídrico (rango de pH 7,15 a 8,93). Las líneas de puntos marcan un límite aproximado (ya que hay solapamiento) del pH alcanzado por cada tipo de buffer. Puntos blancos: β-Gal$_{E.coli,}$ Puntos negros: β- Gal$_{His6.}$

Se demostró que la actividad máxima de las dos enzimas està alrededor de pH 7 y que la actividad de β-Gal$_{His6}$ pareció ser menos susceptible al cambio de pH en un rango de 6,2 a 8,00. Se evidenció un efecto

inactivador del ión citrato con respecto al ión fosfato el cual se observa claramente a pH 6, siendo muy superior la actividad registrada en este último buffer. Si bien, se ha reportado al buffer Tris/HCl como inactivador de β-Gal (Ullman, et al., 1967) no se observaron diferencias en el efecto de este buffer con respecto a buffer fosfato en un rango de 7,3 a 8,00 para ninguna de las enzimas.

Efecto del tiempo de incubación

La cantidad de producto formado fue proporcional al tiempo de incubación en un lapso de tiempo de 10 a 330 minutos.

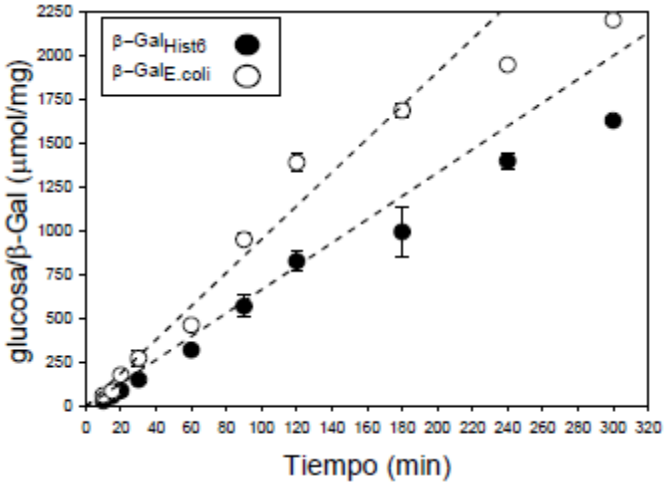


Figura. 6. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad catalítica de β -Gal. . Rango 10 a 330 minutos. Puntos blancos: β-Gal$_{E.coli}$ D. Puntos negros: β-Gal$_{E.\ coli}$ ND. Se realizaron las regresiones lineales de las dos curvas y se observó linealidad hasta los 180 minutos aproximadamente. En línea de puntos se muestra la regresión lineal correspondiente.

La actividad específica mostró un comportamiento lineal con respecto al tiempo de incubación hasta los 180 minutos inclusive. El comportamiento fue muy similar, entre ambas enzimas y se observó mayor actividad en la β-Gal nativa. En esta curva se observó que el tiempo de incubación de 20 minutos (utilizado en el resto de los experimentos) se encuentra dentro del rango lineal y por lo tanto responde a la condición de velocidad inicial.

Determinación de los parámetros cinéticos de β-Gal

Se midió la velocidad inicial en función de la concentración de lactosa con el fin de determinar los parámetros cinéticos de ambas enzimas. Para ello se utilizaron condiciones estándar de pH, temperatura y tiempo definidas anteriormente.

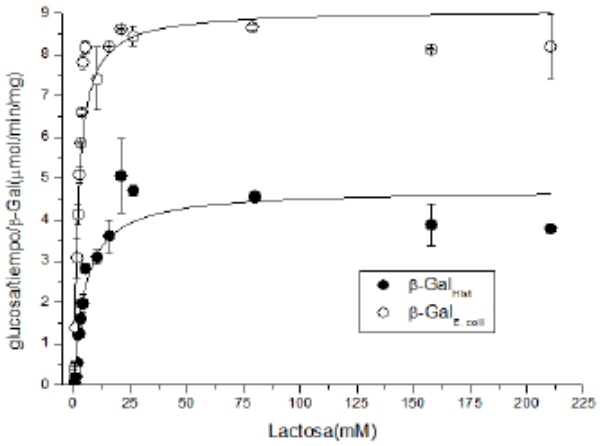


Figura. 7 Curvas de Lactosa. Loa puntos corresponden a los valores experimentales y la linea continua indica el ajuste de la ecuación de Michaelis-Menten. Los parámetroscinéticos se determinaron por medio de un análisis de regresión no lineal por el método de los cuadrados mínimos de las curvas de velocidad inicial. Puntos blancos: β-Gal$_{E.coli}$. Puntos negros: β-Gal$_{Hist6}$.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de actividad de β-Gal.

	K_M (media ± sd) (mM)	**Vmax (media ± sd) (µmol/min/mg)**
β-Gal$_{Hist6}$	4,3 ± 0,2	4,1 ± 0,2
β-Gal$_{E.coli}$	4,1 ± 0,4	9,1 ± 0,1

Los parámetros cinéticos se determinaron por regresión no lineal por el método de cuadrados mínimos a partir de los datos mostrados en la Fig.7..

Las KM de ambas enzimas fueron similares entre si, lo cual indicó que el agregado de residuos de histidinas no afectó la afinidad de la enzima por el sustrato. La velocidad máxima (Vmax) fue mayor en la enzima nativa.

En todas las curvas analizadas la actividad de la enzima nativa (β-Gal$_{E.coli}$) fue superior
a la actividad de la enzima recombinante (β-Gal$_{Hist6}$). La Fig. 4 muestra que la mayor actividad en las dos enzimas se logra a 50 ºC e inmediatamente después de superar esta temperatura ocurre una abrupta caída de la actividad, por ello se recomienda trabajar en condiciones de temperatura por debajo de los 50 ºC. Según estudios previos a partir de los 40ºC aproximadamente, se observan cambios conformacionales en β-Gal inducidos por temperatura (Tmβ-Gal$_{E. coli}$ = 60ºC) (Sanchez et al., 2013). Por esto la temperatura seleccionada para estudiar el comportamiento de otros factores sobre la actividad fue 37ºC. Esto se debió, a que a esta temperatura la actividad aumenta proporcionalmente.
β-Gal nativa presenta 3 aminoácidos de histidina (391, 418 y 540) conservados evolutivamente, que están localizados en el sitio activo y parecen estar involucrados en la catálisis por la interacción con el intermediario galactosil-enzima (la glucosa se libera y la galactosa continua retenida en la enzima, en la primera etapa de la reacción de hidrólisis de la lactosa) de la reacción (Huber et al., 2001). Como muestra la Fig.8, las histidinas adicionales en el extremo carboxilo terminal de cada monómero (círculo verde) parecerían no interactuar con el sitio activo (círculo naranja). Sin embargo no se puede descartar algún efecto relacionado con la interacción de estos aminoácidos con el intermediario galactosil-enzima. Por otra parte, los 50 aminoácidos del extremo carboxilo terminal contribuyen a estabilizar el contacto entre los 4 monómeros de la estructura proteica, por lo tanto se podría especular que la presencia de las seis histidinas adicionales en β-Gal$_{Hist6}$ podrían tener algún efecto sobre esta interacción.

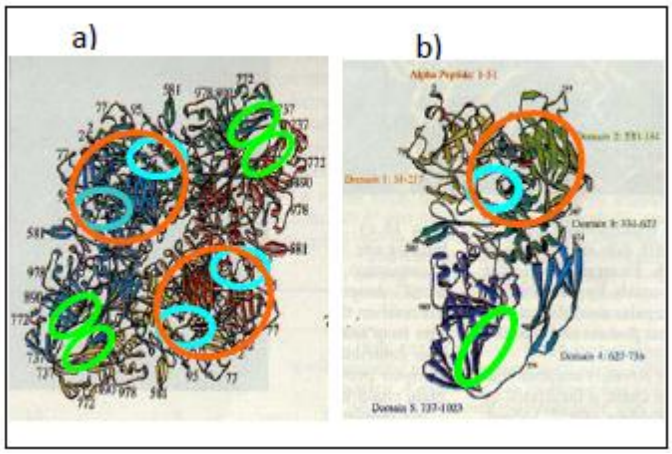


Figura. 8. Estructura molecular de β -Gal**.** a) Tetrámero de β-Gal (forma activa de β-Gal). b) Monómero de β-Gal. Verde: región del carboxilo terminal donde se incorporan las histidinas. Celeste: región donde se unen los Mg^{2+} que aumentan la actividad. Anaranjado: región del sitio activo de β-Gal.

Algún efecto en la estabilidad/conformación del tetrámero inducido por estos aminoácidos nuevos podría explicar el efecto sobre los valores observados de actividad/estabilidad.

.

Recuperación de la actividad de β-Gal frente al tratamiento térmico

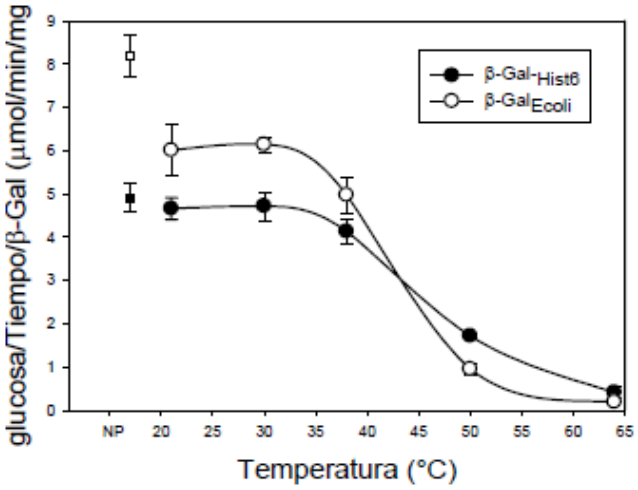


Figura. 9. Reversibilidad de la actividad frente al tratamiento térmico. Se determinó la actividad enzimática luego de la preincubación de las enzimas a distintas temperaturas. Puntos blancos: β-Gal$_{E.coli.}$ Puntos negros: β-Gal$_{Hist6}$. NP en eje de abscisas indica la actividad de la enzima no preincubada.

Ambas enzimas soportaron hasta una temperatura de preincubación de 30°C. Esto se debió probablemente a los cambios conformacionales que comienza a sufrir la proteína a partir de los 40 ºC (Sanchez et al,2013). Las enzimas perdieron gran parte de su actividad cuando se las preincubó a 50°C y a 65°C su actividad fue casi nula. A temperaturas mayores de 40°C se observó que la enzima recombinante presentó mayor resistencia a la inactivación por temperatura denotado por un cambio más gradual en la actividad al aumentar la temperatura. Se observó además que la enzima preincubada de β-Gal*E.coli* presentó menor actividad (25% menor) que el control con enzima no preincubada (condición NP, Fig. 9). En β-Gal$_{Hist6}$ este efecto no se observó.

***Reversibilidad al efecto del pH*.**

Recuperación de la actividad de β-Gal frente a la preincubación en medio con diferentes pH

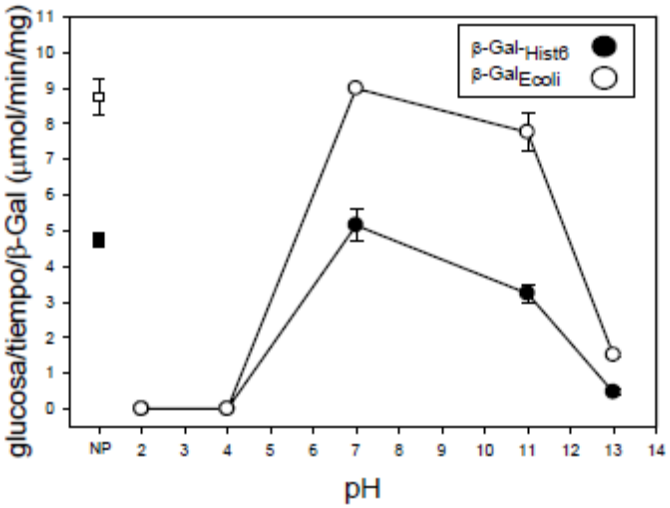


Figura. 10 . Curvas de reversibilidad al pH. Se determinó la actividad enzimática luego de la preincubación de las enzimas a distintos pH.Puntos blancos: β-Gal$_{E.coli}$, Puntos negros: β-Gal$_{Hist6}$. NP en el eje de abscisas indica la actividad de la enzima no preincubada.

El comportamiento frente a la preincubación a pH extremos es similar en ambas enzimas. Las enzimas presentaron inactivación cuando se las colocó a pH menores de 4. Sin embargo, resultaron ser resistentes a pH básicos y lograron actividades medibles hasta una preincubación a pH 13 (Fig. 10). Este efecto se presentó de forma similar en ambas lactasas. Se demostró que las enzimas son bastante resistentes a la inactivación por preincubación a pH moderadamente básicos.

CONCLUSIONES

Se logró sobreexpresar β -Gal con un alto grado de pureza. Se determinó la condición de cultivo que presentó mayor eficiencia en la producción de proteína activa Si bien en todas las curvas analizadas la actividad de la enzima nativa (β-Gal$_{E.coli}$) fue superior a la actividad de la enzima recombinante (β-Gal$_{Hist6}$) esta última pareció demostrar mayor resistencia a la temperatura y al pH. Estos resultados son alentadores para continuar explorando la posibilidad de utilizar la enzima recombinante por ejemplo en procesos de deslactosado en condiciones de alta temperatura.

REFERENCIAS

Alibolandi, Mona and Mirzahoseini, H. 2009. Chemical Assistance in refolding of Bacterial inclusión bodies. American Lournal of Biochemistry and Molecular Biology. 631607: 1-6, doi:10.1155/2011/631607

Brenchley, J. P. 1996. Psycrophilic microorganism and their cold active enzyme. J. Ind Microbiol. 17:432-437.

Cadel S, Gouzy-Darmon C, Petres S, Piesse C, Pham VL, Beinfeld MC, Cohen P, Foulon T. 2004. Expression and purification of rat recombinant aminopeptidase B secreted from baculovirus-infected insect cells. Protein Expr Purif. 36. 19-30.

Corona B., Rodríguez M., Sánchez L., Machado H., Martínez S. (2009) Expression solubilization, and purification of therecombinant protein MSP5 of Anaplasma marginale isolate. Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ). 24:7169-9896.

Huber, R.E., Kurz, G. and Wallenfells, K. 1976. A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of □-galactosidase (*E. coli*) on lactose. Biochemistry 15. 1994-2001.

Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L & Randall R J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265.

Mateo C, Pessela,BCC; Grazu, V.;Torres,R.; López-Gallego, F., Guisan,JM; Fernandez-Lafuente, R. 2006. One-Step Purification, Immobilization, and Stabilization of Poly-Histidine-Tagged Enzymes Using Metal Chelate-Epoxy Supports. Immobilization of Enzymes and Cells Methods in Biotechnolog™. En. José M. Guisan. 2º ed. 22, New Jersey. Estados Unidos. pág.117-128Raba, J. and Mottola, H. A. 1995. Glucose Oxidase as an Analytical Reagent. Critical Reviews in Analytical Chemistry 25 (1): 1–42.

Sako, T, Matsumoto, K, Tanaka, R. 1999. Recent progress on research and application of non-digestible galacto-oligosacharides. Int Dairy J. 9:69-80.
Sánchez, J.M. Barra, JL, Argaraña, C and Perillo, MA. 2009. Interfasial activity of □-galactosidase from *E. coli* fused to an histidine hexapeptide. Biocell. 33: A263.
Sanchez, JM, Nolan, MV and Perillo, MA. 2013. ß-Galactosidase at the membrane-water interface. A case of an active enzyme with non-native conformation. *Colloids and surfaces B* 108: 1-7
Sheridan, PP., Brenchley, JE. 2000. Characterization of a Salt tolerant Family 42 β-Galactosidase from a *Psycrophilic Antartic Planococcus Isolat*e. Appl Environ Microbiol 66. 2438–2444
Tanaka, H., Meisler, M. and Suzuki, K. 1975. Activity of human hepatic β-galactosidase toward natural glycosphingolipid substrates. Biochim.Biophys.Acta. 398:452-463.
Turina, A. del V., Marín, G. and Perillo, M.A. 2002. Comportamiento de Mezclas de fosfolípidos zwitteriónicos con triglicéridos y detergentes en la interfase agua-aire. XXXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica – Buenos Aires. Argentina.
Ullman, A., Jacob, F. and Monod, J. 1967. Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator proximal segment of beta galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 24, 339-343.

AGRADECIMIENTOS
Este trabajo fue financiado por CONICET, SECyT, Universidad Nacional de Córdoba y ANPCyT. Argentina

Pre-treatment with diatomaceous earth in the sugar cane molass and corn steep liquor

Machado W.R.C., Ramos J.J.M., Sa C.S., Rodrigues A.B., Burkert, J.F.M.

FURG - Federal University of Rio Grande. Brazil.
whallansfm@hotmail.com

Abstract: The use of coproducts as culture medium is a way to replace the synthetic media however, these alternative substrates may exhibit high concentrations of heavy metals which may retard microbial growth. The Heavy metals can be removed by suitable pre-treatments promoting an clarified aspect without interfering in the submerged culture. The aim of this work was to study the conditions for pre-treatment of corn steep liquor (CSL) and sugar cane molasses using diatomaceous earth, through two 2^3 rotational central composite designs. For CSL and molasses, respectively, clarification of 87.94% and 68.11% was observed with a reduction in total reducing sugars (TRS) of 16.43% and 56.85%, and a pH variation of 0.19 and 0.14 when compared to coproducts without pre-treatment. Thus, to obtain a satisfactory clarification for corn steep liquor 6% diatomaceous earth at 60 °C for 80 min and molasses 6-7% diatomaceous earth at 60°C for 80 to 90 min are required.

Keywords: coproducts, pre-treatment, diatomaceous earth.

Resumo: A utilização de coprodutos como meio de cultivo é uma forma de substituir os meios sintéticos, entretanto estes substratos alternativos podem apresentar altas concentrações de metais pesados, retardando o crescimento microbiano, porém podem ser removidos através de pré tratamentos adequados promovendo uma aspecto clarificado sem interferir no cultivo submerso. O objetivo desse trabalho foi estudar as condições de pré tratamento da água de maceração de milho (AMM) e melaço de cana de açúcar utilizando a terra diatomácea, através de dois delineamentos central composto rotacional 2^3. Para AMM e melaço, respectivamente, foram observados uma clarificação de 87,94% e 68,11% com redução de açúcar redutor total (ART) de 16,43% e 56,85%, e uma variação de 0,19 e 0,14 no pH quando comparados aos coprodutos sem pré tratamento. Dessa forma, para obtenção de uma clarificação satisfatória para água de maceração de milho são necessários 6% de terra diatomácea, a 60ºC por 80 min e para o melaço 6 a 7% de terra diatomácea, a 60°C durante 80 a 90 min.

Palavras-chaves: coprodutos, pré tratamento, terra diatomácea.

INTRODUCTION

Brazil has a variety of co-products in abundance such as sugar cane molasses and corn steep liquor (CSL) with great economic and ecological appeal that can be used as substrates for culture medium for different micro-organisms, as alternative carbon and nitrogen sources for obtaining a bioproduct.

Substrates such as molasses are subproducts of the sugar industry which present certain nutrients such as reducing sugars and minerals that can favor the submerged culture when used. However, the corn steep liquor is a coproduct from moist corn milling, that presents vitamin B complex and a variety of minerals such as K, P, Mg, Na, Ca, Fe, Zn, Mn, Cr, Cu (Yuan 2011). Thus, the use of these low cost substrates is an alternative to minimize the volumes of industrial wastes (Nascimento *et al.* 2007).

On the other hand, agroindustrial media have a variable composition due to their complexity, which can be responsible for the inhibition of yeasts (Treichel 2004). High concentrations of heavy metals in culture medium can result in serious problems during culturing, such as retarding microbial growth, production of other bioproducts which can cause intoxication of the inoculum and interference of the pH (Roukas 1998, Berwanger 2005). However, these contaminants found in agroindustrial medium can be partially removed with an appropriate pre-treatment which enables obtaining culture media with clarified aspect, causing no interference in submerged culture and promoting a productivity greater than that of media without treatment.

Sulfuric acid, phosphoric acid, potassium ferrocyanide, tricalcium phosphate, ethylenediaminetetraacetic (EDTA), disodium salt, active carbon, filtration (gases and cotton) cation exchange resin and modified membrane are reported as pre-treatments to agroindustrial coproducts constituents of culture mediums such as cane molasses, beet molasses, soy textured residue, corn steep liquor and rice straw at different process conditions, achieving an increase in production compared to medium without pre-treatment.

Thus the correct adaptation of these methods for the culture medium has great significance and may ensure increased economic viability of the bioproducts obtained at the end of the culturing. In this context, the aim of this study was to use a diatomaceous earth as a pre-treatment in the molasses and corn steep liquor so as to promote better clarification and possible removal of metals to enhance efficiency in diverse productions of different bioproducts.

MATERIALS AND METHODS

The corn steep liquor and sugar cane molasses were used at a concentration of 100 $g.L^{-1}$. The experiments were performed in flasks with agitation of 150 rpm (Valduga *et al.* 2007). After the pre-treatment the substrates were centrifuged (1957 xg for 10min) and filtered through a funnel over a Kitasato flask containing a filtration column, consisting of filter paper, 3.5 g of diatomaceous earth and a layer of cotton coupled a vacuum pump. They were studied separately through two 2^3 rotational central composite designs (8 assays + 6 assays in the axial section + 3 center points) with the independent variables: concentration of diatomaceous earth, contact time of diatomaceous earth with the agroindustrial substrate and temperature of pre-treatment (Treichel 2004) shown in **Table 1**.

Analytical methodology

Determination of pH

The pH determination was performed by scanning the sample in a potentiometer according to AOAC (2000).

Optical Density

The determination of the optical density was performed by scanning the sample in a spectrophotometer (Biospectro SP-220, China), with an absorbance reading at 620 nm (Roukas 1998).

Determination of the concentration of total sugars

The concentration of TRS was determined by the DNS method (Miller 1959).

Statistical Analysis

To evaluate the performance of diatomaceous earth in agroindustrial substrates, the assays will be conducted in triplicate at center point and all statistical analysis using the Statistica software 7.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Pre-treatment with diatomaceous earth for corn steep liquor

A 2^3 rotational central composite design, for each subproduct (coproduct) in a study was conducted to evaluate the effect of independent variables in the clarification of the culture medium, through the optical density responses, pH and total reducing sugar after pre-treatment, as shown in **Table 1**.

Tabela 1: Second rotational central composite design ³ (actual values and coded) for the pre-treatment with diatomaceous earth to corn steep liquor and molasses.

	Matrix			AMM			Molasses		
Assay	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**Y_1**	**Y_2**	**Y_3**	**Y_1**	**Y_2**	**Y_3**
1	6 (-1)	64 (-1)	1,5 (-1)	4,12	0,148	4,04	70,03	0,679	4,2
2	8 (+1)	64 (-1)	1,5 (-1)	1,77	0,076	4,14	28,63	0,610	4,27
3	6 (-1)	76 (+1)	1,5 (-1)	2,39	0,121	4,05	26,37	0,471	4,00
4	8 (+1)	76 (+1)	1,5 (-1)	2,28	0,202	4,02	21,62	0,118	5,14
5	6 (-1)	64 (-1)	2 (+1)	1,61	0,094	4,12	32,74	0,638	4,14
6	8 (+1)	64 (-1)	2 (+1)	1,63	0,253	4,10	26,57	0,314	4,34
7	6 (-1)	76 (+1)	2 (+1)	1,27	0,281	4,11	24,84	0,426	4,26
8	8 (+1)	76 (+1)	2 (+1)	1,00	0,318	4,11	68,77	0,164	5,44
9	5,32 (-1,68)	70 (0)	1,75 (0)	1,65	0,101	4,12	38,94	0,149	5,33
10	8,68 (+1,68)	70 (0)	1,75 (0)	1,73	0,130	4,09	23,46	0,362	4,27
11	7 (0)	60 (-1,68)	1,75 (0)	1,65	0,094	4,13	71,63	0,187	5,33
12	7 (0)	80 (+1,68)	1,75 (0)	1,07	0,158	4,12	49,07	0,497	4,02
13	7 (0)	70 (0)	1,33 (-1,68)	1,42	0,137	4,15	73,19	0,433	4,36
14	7 (0)	70 (0)	2,17 (+1,68)	1,24	0,094	4,12	70,04	0,456	4,52
15	7 (0)	70 (0)	1,75 (0)	1,59	0,079	4,07	73,81	0,256	3,97
16	7 (0)	70 (0)	1,75 (0)	1,59	0,069	4,09	71,24	0,279	3,88
17	7 (0)	70 (0)	1,75 (0)	1,51	0,068	4,08	63,43	0,311	4,31

X_1: Percent of diatomaceous earth; X_2: Temperature (°C); X_3: Contact time (h) Y_1: Total reducing sugar ($g.L^{-1}$); Y_2: Optical density (O.D); Y_3: pH. Corn steep liquor without pretreatment: Y_1: 4,93 $g.L^{-1}$, Y_2: 0,63 e Y_3: 3,9. Molasses without pretreatment: Y_1: 164,12 $g.L^{-1}$; Y_2: 0,37 e Y_3: 5.

In **Table 1** it can be seen that in all sixteen trials there were losses of total reducing sugars, varying from 1.24 up to 4.12 $g.L^{-1}$, compared to corn steep liquor without pretreatment (4.93 $g.L^{-1}$), noting a loss of up to 16.43% (assay 1) of its total reducing sugars (TRS). The same behavior occurred with the optical density which showed variations of 49.52% (assay 8) to 87.94% (assay 2) for clarification. However, the different pre-treatment conditions induced a significant reduction in the pH of the coproduct, as shown in **Table 2.**

The main effect of an independent variable can be understood as the change caused in the response (dependent variable) when one runs through all levels of variation of the independent variable being assessed separately from other variables (Rodrigues and Iemma 2009).

For the response total reducing sugars (**Table 2**) increasing the concentration of diatomaceous earth, temperature and contact time diatomaceous earth with corn steep liquor caused a decline of the sugars by presenting a significant negative effect (p<0.10). However, for optical density the increase of the three independent variables and their interactions, except percentage of land x temperature were statistically significant (p<0.10) for the ranges studied, but for further clarification of the coproduct to occur these variables should be in the lower level (-1).

Table 2: Results of effects, standard deviation, toe for total reducing sugar, pH and optical density after pre-treatment of corn steep liquor with diatomaceous earth.

	Factor	Effect	Standard deviation	t (2)	*p**
Total reducing sugar ($g.L^{-1}$)	**Mean**	1,887	0,014	135,595	<0,001
	(1) X_1 (L)*	-0,678	0,033	-20,744	0,002
	(2) X_2 (L)*	-0,548	0,033	-16,764	0,003
	(3) X_3 (L)*	-1,262	0,033	-38,656	<0,001
	X_1xX_2*	0,488	0,033	14,927	0,004
	X_1xX_3*	0,553	0,033	16,917	0,003
	X_2xX_3	0,062	0,033	1,914	0,196
	Factor	**Effect**	**Standard deviation**	**t (2)**	***p****
Optical density (O.D)	**Mean ***	0,155	0,002	82,576	<0,001
	(1) X_1 (L)*	0,051	0,004	11,615	0,007
	(2) X_2 (L)*	0,088	0,004	19,961	0,003
	(3) X_3 (L)*	0,100	0,004	22,596	0,002
	X_1xX_2	0,008	0,004	1,817	0,211
	X_1xX_3*	0,047	0,004	10,585	0,009
	X_2xX_3*	0,038	0,004	8,735	0,013
	Factor	**Effect**	**Standard deviation**	**t (2)**	***p*** **
pH	**Mean ***	4,085	0,003	1354,690	<0,001
	(1) X_1 (L)	0,012	0,007	1,768	0,219
	(2) X_2 (L)*	-0,027	0,007	-3,889	0,060
	(3) X_3 (L)*	0,047	0,007	6,718	0,0215
	$X_1x X_2$*	-0,027	0,007	-3,889	0,060
	$X_1x X_3$*	-0,023	0,007	-3,182	0,086
	$X_2x X_3$*	0,027	0,007	3,889	0,060

** ($p < 0,10$); * ($p < 0,05$). X_1: Percentage of land; X_2: Temperature (°C); X_3: Contact time (h).

Pre-treatment with diatomaceous earth for molasses

A 2^3 rotational central composite design with two central points was performed in order to evaluate the effect of the variables; diatomaceous earth concentration, contact time with the coproduct and temperature of pre-treatment for the sugar cane molasses so as to define the conditions leading to the clarification of the medium without the bioproduction of carotenoids. The matrix of experimental designs with real and coded values, as well as in responses in optical density reading and pH for molasses, are presented in **Table 1**.

In **Table 1** one can see that the pre-treatment had an effect decreasing total reducing sugars with losses of 56.85% (assay 15), 86.83% (assay 4) compared to the one without pretreatment. For optical density it is seen that there is a variation from 0.118 (assay 4) to 0.679 (assay 1); however, for some assay the earth was inefficient, increasing turbidity in some assay. For some other experiments however, it promoted clarification when compared to the one with no pre-treatment (0.37). The initial pH showed a range from 3.88 (assay 17) to 5.14 (assay 9 and 10) for the range studied. **Table 3** presents the effects, standard deviation and confidence limits for the variables that were statistically significant.

Table 3: Results of effects, standard deviation, toe for total reducing sugar, pH and optical density after pretreatment of molasses.

	Factor	effect	Standard Deviation	t (6)	*p**
Total reducing sugar ($g.L^{-1}$)	**Mean ***	74,102	8,830	8,397	<0,001
	(1) X_1 (L)	-5,042	6,782	-0,743	0,485
	X_1 (Q)*	-36,692	8,242	-4,452	0,004
	(2) X_2 (L)	-7,955	6,783	-1,172	0,285
	X_2 (Q)	-16,0,36	8,242	-1,946	0,100
	(3) X_3 (L)	0,143	6,783	0,021	0,984
	X_3 (Q)	-8,054	8,242	-0,977	0,366
	X_1xX_2*	21,69	8,858	2,448	0,050
	X_1xX_3*	20,978	8,858	2,368	0,056
	X_2xX_3*	21,243	8,858	2,398	0,053
	Factor	**Effect**	**Standard Deviation**	**t (1)**	***p*****
Optical density (O.D)	**Mean ***	0,260	0,012	22,369	0,028
	(1) X_1 (L)	-0,095	0,009	-10,665	0,595
	X_1 (Q)	0,027	0,011	2,470	0,245
	(2) X_2 (L)	-0,079	0,009	-8,878	0,071
	X_2 (Q)	0,088	0,011	8,145	0,078
	(3) X_3 (L)*	-0,044	0,009	-4,897	0,128
	X_3 (Q)	0,161	0,011	14,826	0,043
	X_1xX_2	-0,056	0,012	-4,782	0,131
	X_1xX_3	-0,041	0,012	3,505	0,177
	X_2xX_3	0,084	0,012	7,245	0,087
	Factor	**Effect**	**Standard Deviation**	**t (1)**	***p*****
pH	**Média***	3,946	0,045	87,963	0,007
	(1) X_1 (L)	0,119	0,034	3,442	0,180
	X_1 (Q)*	0,522	0,042	12,464	0,051
	(2) X_2 (L)	-0,046	0,034	-1,322	0,412
	X_2 (Q)*	0,433	0,042	10,348	0,061
	(3) X_3 (L)	0,123	0,034	3,568	0,174
	X_3 (Q)*	0,267	0,042	6,371	0,099
	X_1xX_2*	0,513	0,045	11,389	0,056
	X_1xX_3	0,043	0,045	0,944	0,518
	X_2xX_3	0,138	0,045	3,056	0,201

** (p<0,10); * (p<0,05); X_1: Percentage of land; X_2: Temperature (°C); X_3: Contact time (h)

Observing **Table 3** for the total reducing sugars one realizes that only the variable percentage of earth was significant (p<0.05), with a negative effect, removing more sugars present in the coproducts, thus this being at a lower level (-1).

For the optical density of the substrate after pre-treatment it was noted that the variable contact time was significant (p<0.1), but its effect was negative for clarification when the level was increased, increasing its turbidity, **Table 3**.

The initial pH showed a significant difference (p<0.10) in which the variables percentage of earth, temperature, temperature and interaction of these two variables had a positive effect when increasing its level, **Table 2**.

Model checking for responses total reducing sugar and initial pH

Considering the three variables of the process: percentage of earth, temperature and contact time with the substrate, a first order model was tested excluding the axial points, however the nonlinear second-order model adjusted better to the experimental data, the total reducing sugar response was analyzed according to the dependent variables.

For the verification of the model, regression coefficients were calculated and ANOVA performed. Results are shown in **Table 4**. The terms that were not significant were added to the lack of fit to calculate the analysis of variance.

Table 4: Analysis of variance for the central composite rotational design 23 for the total reducing sugar

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	*p* - value
Regression	3728,12	2	1864,06	6,68
Rresidue	3625,88	13	278,91	
Total	7254,0	15		

Total reducing sugar (R: 0,71, $P_{2;\ 13\ 0,95}$= 3,81).

The correlation coefficients (R): 0.71 was calculated by ANOVA (**Table 4**) for the total reducing sugar; therefore, it can be concluded that the model fitted well to the experimental data. The p-value/p-table ratio was 1.7 for total reducing sugar, making the model predictive and meaningful for the response studied in this range.

Thus it was possible to generate the model equation with the coded variables representing the responses of the RCCD as a function of variables percentage of earth, temperature and contact time, as shown in Equation 1.

$$ART\ (g.L^{-1}): 60 - 14{,}78.X_2^2 + 10{,}84.X_1.X_{2\ (1)} \qquad (1)$$

where: X_1: percent diatomaceous earth; X_2: Temperature; X_3: Contact time with the substrate.

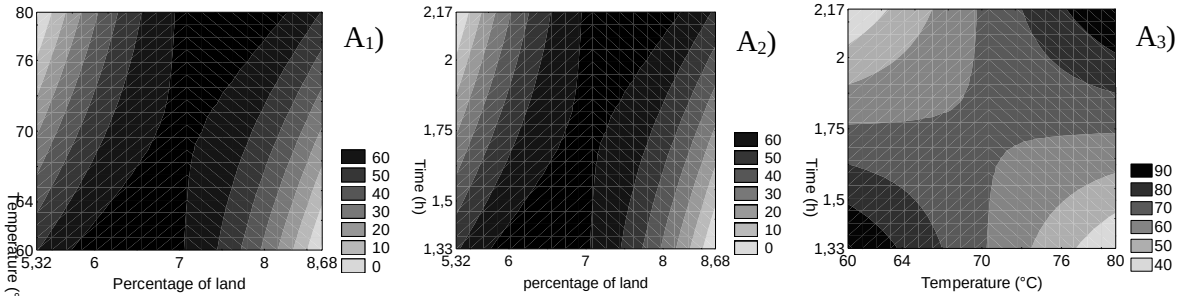


Figure 1: Contour curves for total reducing sugar response (A_1, B_2, and A_3) for pre-treated molasses.

Using the model it was possible to construct contour curves (**Figure 1**), obtaining concentrations of the variables: the percentage of earth, temperature and time of contact with the substrate.

With the contour curves shown in Figure 1 it is verified that to keep a high sugar rate on the substrate one can work with a low temperature 60 to 64°C and percentage of earth of 6 to 7% or high temperatures 76-80°C with earth percentage of 7-8% (**Figure 1 A_1**). Percentage of earth should be 6-7% with a contact time from 1.33 to 1.5 h, or one can work at high earth percentage from 7 to 8% and contact time from 2 to 2.17h (**Figure 1 A_2**).

In the use of a temperature of 60°C one should work with time of 1.33 h, or high temperature of 80°C with a time of 2.17 hours (**Figure 1 A_3**). Therefore the best condition for the sugars present in the substrate must work with 6-7% diatomaceous earth at 60°C and contact time from 1.33 to 1.5 h under stirring at 150 rpm in a reactor (300 mL) cased to remove heavy metals and possibly increase various types of bioproduction when working with this type of coproducts. According to Machado (2013) who used *Sporidiobolus pararoseus* for production of carotenoids in medium formulated corn steep liquor (6.5 $g.L^{-1}$) and sugar cane molasses (40 $g.L^{-1}$) pre-treated with these coproducts land diatomaceous obtained a gain of approximately 9% increase in production in carotenoids (570.95 $\mu.L^{-1}$), besides an increase in biomass of 20% (9.43 $g.L^{-1}$) when compared to the culture medium without prior treatment.

CONCLUSION

The most adequate pretreatment with diatomaceous earth for corn steep liquor was 6% diatomaceous earth at 60°C for 80 min. and for the cane molasses was 7 to 8% diatomaceous earth at 60°C for 80 to 90 min. Thus in these conditions there was a satisfactory clarification of 87.94% and 68.11% for CSL and molasses, respectively, compared to coproducts with no pretreatment. From these results a new 2^3 rotational central composite design will be carried out with the range of diatomaceous earth studied being from 3.33 to 6.67%, temperature 25 to 39°C and 0.5 to 1.5 hours of contact time to promote better clarification and remove less sugar present in the coproducts and decrease the contact time to achieve a satisfactory pre-treatment for bioproduction.

BIBLIOGRAPHY

Association of Official Analytical Chemists – AOAC.; Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists, 17th ed., AOAC International: Washington, 2000.

Berwanger ALS. 2005. Production and characterization of biopolymer synthesized by *Sphingomonas capsulata*. Erechim – RS, 96pag. Dissertation (in Engineering Postgraduation food). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

Muller MC., Rodriguez-Amaya, DB., Lourenço SO.2003. Carotenoids of the cyanobacterium *Synechocystis pevalekii* produced under normal conditions and under nutrient limitation. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 39:415-423.

Nascimento WCA., Silva CR., Carvalho RV., Martins MLL. 2007Optimization of a culture medium for the production of proteases by a *Bacillus sp*. Termofílico. Science and Food Technology, 27:417-421, 2007.

Rodrigues MI., Iemma AF. 2011. Design of Experiments and Optimization processes: a strategy of sequential planning. Campinas: Casa do Pão Editora.

Roukas T. 1998. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. Process Biochemistry, 33:805-810.

Treichel H. 2004. Study of optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in industrial pretreated. Campinas – SP, 99pag. Thesis (Graduate Studies in Food Engineering). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

Valduga E., Valério A., Treichel H., Luccio M. 2007. Pre-treatment of sugar cane molasses and water maceration for the bioproduction of carotenoids. Química Nova, 30:1860-1866.

ACKNOWLEDGMENT

CNPq and CAPES for financial support.

Production of carotenoids by yeast *Sporidiobolus pararoseus* using coproducts

Machado W.R.C., Ramos J.J.M., Sá C.S., Rodrigues A.B., Burkert J.F.M.

FURG - Universidade Federal do Rio Grande. Brasil.
whallansfm@hotmail.com

Abstract - An important characteristic of the production of a bioproduct is the formulation of a promising industrial culture medium which can utilize low cost raw material. For bioproduction of carotenoids which exert an important biological function, carbon sources of the molasses from sugarcane (1.8 to 58.2 $g.L^{-1}$) and nitrogen from corn steep liquor (2.27 to 10.73 $g.L^{-1}$) were combined through central composite rotational design 2^2, seeking to increase the production of carotenoids by *Sporidiobolus pararoseus* yeast, at 25°C, 180 rpm and initial pH 6. With culture medium containing 30 to 50 $g.L^{-1}$ of molasses and 5.3 to 8.9 $g.L^{-1}$ corn steep liquor in 120 h, obtaining a carotenoids volumetric production of 500 $\mu g.L^{-1}$, a specific carotenoids production of 60.23 $\mu g.g^{-1}$, a cell concentration of 8.12 $g.L^{-1}$, a carotenoid productivity of 4.08 $g.L^{-1}.h^{-1}$ (0.5 $\mu g.g^{-1}.h^{-1}$) and biomass productivity in 0.07 $g.L^{-1}.h^{-1}$. Thus, it was demonstrated the potential of *Sporidiobolus pararoseus* as a source of microbial carotenoids using agroindustrial coproducts.

Keywords: carotenoids, coproducts, *Sporidiobolus pararoseus*.

Resumo - Uma característica importante da produção de um bioproduto é a formulação de um meio de cultivo industrial promissor que possa utilizar matéria prima de custo inferior. Para a bioprodução de carotenoides que exercerem função biológica importante, foram combinadas às fontes de carbono do melaço de cana de açúcar (1,8 a 58,2 $g.L^{-1}$) e nitrogênio da água de maceração de milho (2,27 a 10,73 $g.L^{-1}$) através de um delineamento composto central rotacional 2^2, buscando o incremento na produção de carotenoides pela levedura *Sporidiobolus pararoseus*, a 25°C, 180 rpm e pH inicial 6. Com o meio de cultivo contendo de 30 a 50 $g.L^{-1}$ de melaço e 5,3 a 8,9 $g.L^{-1}$ de água de maceração de milho em 120 h, obtendo uma produção de carotenoides volumétricos 500 $\mu g.L^{-1}$, uma produção específica de carotenoides de 60,23 $\mu g.g^{-1}$, uma concentração celular de 8,12 $g.L^{-1}$, uma produtividade em carotenoides de 4,08 $g.L^{-1}.h^{-1}$ (0,5 $\mu g.g^{-1}.h^{-1}$) e produtividade em biomassa 0,07 $g.L^{-1}.h^{-1}$. Dessa forma demostrando o potencial da *Sporidiobolus pararoseus* como fonte de carotenoides microbianos utilizando coprodutos agroindustriais.

Palavras-chaves: carotenoides, coprodutos, *Sporidiobolus pararoseus*.

INTRODUCTION

Carotenoids are natural pigments used in cosmetics, food and animal rations. Their physiological properties are numerous therefore, it has recently gained wide consumer adoption. The extraction of microbial carotenoids is not dependent on factors such as climatic seasonality, availability of raw materials, when compared to extraction methods in which these plants exhibit less variability in their chemical composition. Yeasts, in turn, stand out among the producer micro-organisms due to its high growth rate, low utilization of space for production and culturing ability in alternative mediums such as agroindustrial coproducts (Silva 2004, Valduga *et al.* 2009).

The dyes obtained microbially have been an alternative and are attracting increasing interest, together with the use of coproducts as the culture medium to minimize production costs and also allowing a reduction in the volumes of agroindustrial waste. The aim of this work was to produce, through submerged cultures, a biomass rich in carotenoids by leveraging *Sporidiobolus pararoseus* sugar cane molasses and corn steep liquor, respectively from the production of sugar and corn wet milling.

MATERIALS AND METHODS

Micro-organism

Sporidiobolus pararoseus yeast previously isolated and identified by Otero (2011) was used. The strain was maintained on agar GYMP (2 $g.L^{-1}$ glucose, 1 $g.L^{-1}$ malt extract, 0.5 $g.L^{-1}$ yeast extract, 0.2 $g.L^{-1}$ NaH_2PO_4 and 1.8 $g.L^{-1}$ agar) stored under refrigeration and reactive in YM agar (3 $g.L^{-1}$ yeast extract, and 3 $g.L^{-1}$ malt extract, 5 $g.L^{-1}$ peptone, 10 $g.L^{-1}$ glucose, 0.2 $g.L^{-1}$ agar) (Coelho , 2005) 72h at 25°C.

Preparation of inoculum
From the tubes containing the micro-organisms in inclined YM agar, the cell suspension was performed in 1 ml of sterile peptone water (0.1%) and added to 9 ml of YM broth and incubated at 25°C for 48h. The inoculum was carried out in Erlenmeyer flasks of 250 ml containing 90 ml of YM medium previously sterilized at 121 °C for 15 min added with the cell suspension and incubated at 25°C, 150 rpm for 48h or the time required to reach $1x10^8$ cells.mL^{-1}, counted using a Neubauer chamber (Silva, 2010).

Culture
Assays were performed in 500 mL Erlenmeyer flasks with 225 mL of medium, initial pH of 6.0 added with 10% of inoculum, initiating culturing with $1x10^7$ células.mL^{-1}, and the process operating conditions being 25°C, 180 rpm for 168h (Silva, 2009). In the first 48 hours of culture, the samples were taken at intervals of 12 hours, and then later at regular intervals of 24 hours until the end of the process (168h) to monitor biomass, pH, total sugars and carotenoids.

Optimization of agroindustrial mediums
The effect of agroindustrial medium composition without pretreatment was studied from the 2^2 rotational central composite design (RCCD), shown in Table 1, with the total carotenoid responses (μg.L^{-1}) and specific carotenoids (μg.g^{-1}), yields, biomass and C/N ratio. For each assay the carbon (C) and nitrogen (N), ratio was determined identifying the best C/N ratio for best production.

Determination of pH
The pH determination was performed by scanning the sample in a potentiometer according to AOAC (2000).

Determination of biomass concentration
Cell concentration along the bioproduction of carotenoids was estimated by reading the absorbance at 620 nm using a standard biomass curve (Kusdiyantini *et al.* 1 998).

Determining the concentration of total carotenoids
To determine the total carotenoids, biomass was first dried for 48h at 35°C, macerated and screened with mesh 115 (Cipollatti 2012). Later on, 0.05 g of this dry biomass was removed, reserved in a test tube and frozen for 48 hours. After the freezing period, the tube was coated with protection from light and thereby initiate the process of chemical disruption with 2 mL of dimethyl sulfoxide - DMSO ($(CH_3)_2SO$) - , homogenized in vortex, and each 15 min time interval, it was again homogenized in vortex for 1 min until a complete contact period of 1h (Fonseca *et al.* 2011). In the same tube, 6 ml of acetone was added to facilitate the extraction. The sample was then centrifuged for 10 min at 1957 xg, part of the solvent was reserved, and the chemical disruption process repeated until total bleaching of the cell.
At the end of the chemical disruption, 10 ml of 20% NaCl solution (p.v^{-1}) and 10 ml of petroleum ether were added to the previously reserved solvent phase. After the formation of the two phases the polar phase was collected and the excess water was removed with sodium sulfate (Na_2SO_4), yielding carotenogenic extracts (Michelon *et al.* 2012). The determination of the total carotenoids in the extracts was performed on a spectrophotometer (Biospectro SP-220, China) through the average value of the maximum absorbance at 448 nm (Cabral *et al.* 2011), using equation 1 (Davies, 1976), and expressed in terms of its major carotenoid (β-carotene in petroleum ether with a specific absorptivity $\boldsymbol{E_{1cm}^{1\%}}$= 2592) according to Davies (1976).

$$CT = \frac{A*V*10^6}{A_{1\,cm}^{1\%}*100*m_{amostra}} \quad (1)$$

where: CT = specific concentration of total carotenoids (μg.g^{-1}); A = absorbance; V = volume (mL); $m_{amostra}$ = dry cell mass (g); $A_{1cm}^{1\%}$= specific absorptivity.

To calculate the volumetric production of total carotenoids (μg.L^{-1}) a unit conversion using the result of the total carotenoids (μg.g^{-1}) and biomass concentration (g.L^{-1}) was performed.

Determination of the concentration of total sugars
The concentration of non-reducing sugars was determined by the DNS method (Miller 1959).
Statistical Analysis

For performance assessment of agroindustrial substrates, the analyses were conducted in triplicate at the midpoint, and the results were statistically analyzed using the software Statistica 7.0 (Statsoft).

RESULTS AND DISCUSSION

The responses evaluated were the maximum values achieved in the volumetric production of carotenoids ($\mu g.L^{-1}$) in each assay, and at the same time their respective values achieved in specific production of carotenoids ($\mu g.g^{-1}$), the biomass ($g.L^{-1}$), the productivity ($g.L^{-1}.h^{-1}$) and C/N ratio of each medium.

Table 1 presents a planning matrix with the actual and coded values of the variables under study, as well as their responses. **Figure 1** shows the accompaniment of this bioproduction of carotenoids, involving the production of volumetric carotenoid (A), specific carotenoid (B), cell production (C), pH (D) and total reducing sugar (E) for factorial design assays.

In **Table 1**, a variation in responses due to different compositions of the production mediums can be seen, the maximum volumetric production of carotenoids ranged from 89.52 $\mu g.L^{-1}$ (assay 5) to 555.52 $\mu g.L^{-1}$ (assay 6), the biomass concentration from 1.03 $g.L^{-1}$ (assay 5) to 8.12 $g.L^{-1}$ (assay 10) and the C/N ratio of the production mediums from 7.70 (assay 5) 38.41 (assay 2). The volumetric productivity of carotenoids ranged from 0.75 $g.L^{-1}.h^{-1}$ (assay 2) to 4.08 $g.L^{-1}.h^{-1}$ (assay 10) and the biomass productivity from 0.01 $g.L^{-1}.h^{-1}$ (assay 5) to 0.07 $g.L^{-1}.h^{-1}$ (assay 10).

Note in **Table 1** that the condition of the assay 6, formulated with 58.2 $g.L^{-1}$ of molasses and 6.50 $g.L^{-1}$ corn steep liquor, with a C/N ratio of 34.79 resulted in the greatest volumetric bioproduction (555.52 $g.L^{-1}$) in 168h of culture, from 7.70 $g.L^{-1}$ biomass, presenting carotenoids productivity of 3.31 $g.L^{-1}.h^{-1}$ and biomass productivity of 0.05 $g.L^{-1}.h^{-1}$.

The pH profile of the cultures (**Figure 1 D**) of all assays for *S. pararoseus* fell in the early hours of culture, with the exception of experiment 3 and 5. This behavior is due to the release of metabolic compounds within the cell that are excreted and subsequently incorporated by the yeast promoting a progressive increase of pH in the culture medium. (Bonfim 1999, Zeni 2011) A Factor already observed previously by Otero (2011) and Cipolatti (2012) for this same micro-organism in other mediums formulated with these agroindustrial coproducts.

Valduga *et al*. (2008) optimized a medium containing molasses (10 to 40 $g.L^{-1}$) and corn steep liquor (0 to 10 $g.L^{-1}$), to produce carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* yeast, where they found that the maximum production was with 40 $g.L^{-1}$ of molasses and 10 $g.L^{-1}$ of CSL, reaching a production of 479.12 $\mu g.L^{-1}$ (71.19 $\mu g.g^{-1}$) at 25°C, 180 rpm for 120 hours of cultire and initial pH of 4. Cipolatti (2012) used cane molasses (6 $g.L^{-1}$) and corn steep liquor (36.5 $g.L^{-1}$) with a C/N ratio of 6.2, for production of carotenoids by the yeast *S. pararoseus*, where the carotenoid production achieved was 830 $\mu g.L^{-1}$ (68.1 $\mu g.L^{-1}$) at 25 °C, 180 rpm for 168 h with an initial pH of 6.

Referring to **Figure 1**, one can see that the yeast consumed nearly all of the sugars available in the culture medium at the end of the process having less than 1.5 $g.L^{-1}$ glucose after 168h of culture.

Studies using crude molasses and CSL compared to synthetic mediums for bioproduction of carotenoids allow replacement of all components because these coproducts such as sugar cane molasses have 36.5% carbon, 1.05% nitrogen, and CSL having 17.83% carbon and 3.80% nitrogen (Mendes 2006, Valduga 2009, Otero 2011, Cipolatti 2012).

Table 1: DCCR 2² (actual values and coded) means for agro with molasses and AMMM.

Assay	X_1	X_2	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5
1	10 (-1)	3,5 (-1)	209,40 (168h)	4,41	23,34	1,25	0,03
2	50 (+1)	3,5 (-1)	340,22 (168h)	5,87	38,41	2,03	0,03
3	10 (-1)	9,5 (+1)	125,92 (168h)	4,80	14,21	0,75	0,3
4	50 (+1)	9,5 (+1)	382,66 (168h)	6,81	29,73	2,28	0,04
5	1,8 (-1,41)	6,5 (0)	89,52 (168h)	1,03	7,70	0,53	0,01
6	58,2 (+1,41)	6,5 (0)	555,52 (168h)	7,70	34,79	3,31	0,05
7	30 (0)	2,27 (-1,41)	403,29 (168h)	4,68	37,87	2,4	0,03
8	30 (0)	10,73 (+1,41)	366,16 (168h)	6,20	23,11	2,18	0,04
9	30 (0)	6,5 (0)	476,51 (120h)	7,93	28,38	3,97	0,07
10	30 (0)	6,5 (0)	489,26 (120h)	8,12	28,38	4,08	0,07

X_1 = Molasses ($g.L^{-1}$); X_2 = Corn steep liquor ($g.L^{-1}$); Y_1 = Volumetric production ($\mu g.L^{-1}$); Y_2 = Biomass ($g.L^{-1}$); Y_3 = C/N (carbon and nitrogen ratio in the culture medium); Y_4 = Volumetric productivity in carotenoids. ($g.L^{-1}.h^{-1}$) e Y_5 = Biomass Productivity ($g.L^{-1}.h^{-1}$).

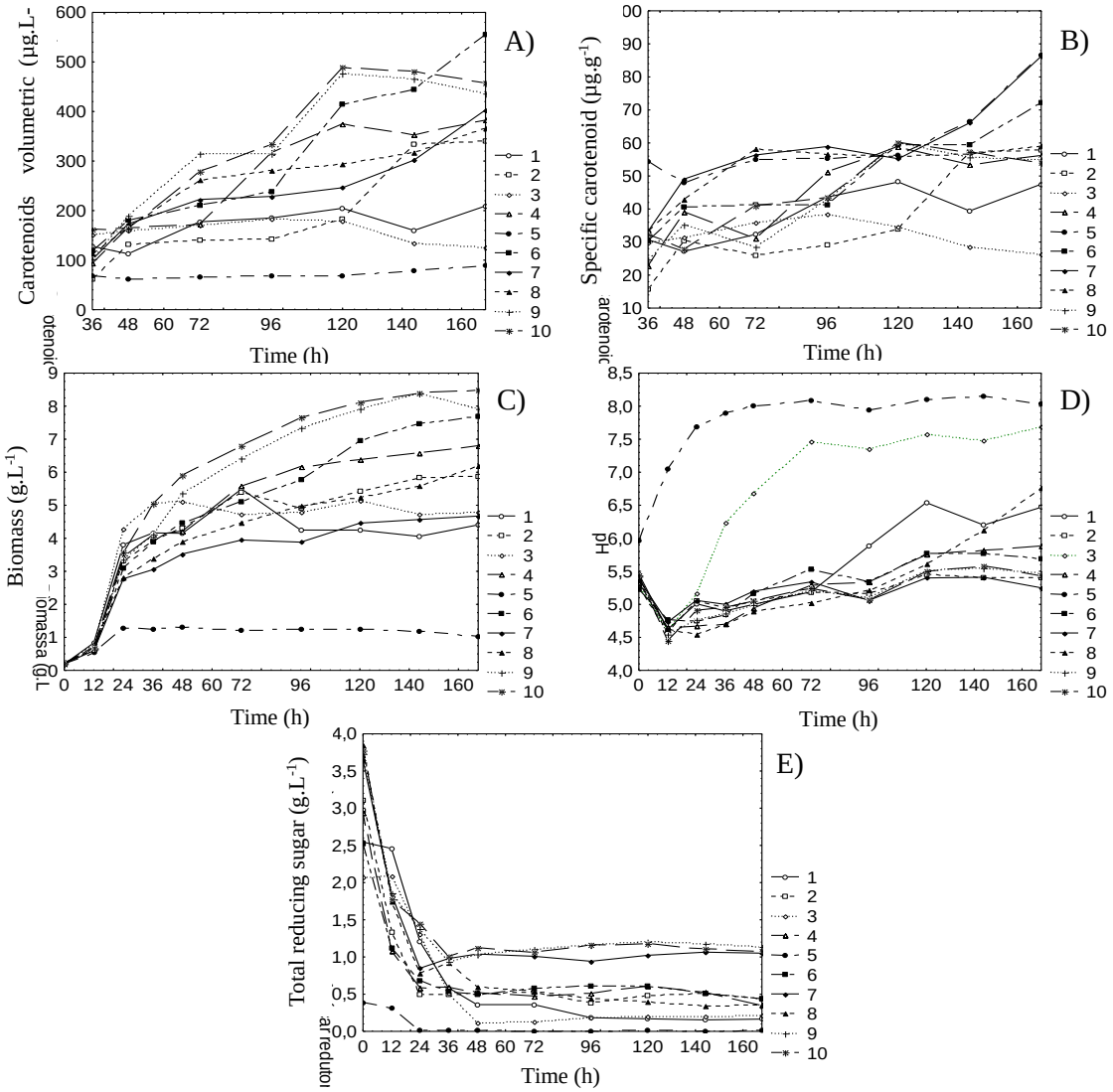


Figure 1: Kinetics of volumetric production of carotenoids (A), production specifies carotenoids (B) biomass (C), pH (D) and total reducing sugar (E) by *S. pararoseus* over 168h at 25°C and 180 rpm on rotational central composite design with 2² culture medium containing molasses and corn steep liquor.

For the construction of empirical models regression coefficients were calculated and ANOVA performed (**Table 3**). With the ratio p-value/p-table exceeding 3 (Rodrigues and Iemma 2011) it was possible to obtain predictive and significant models for all the responses in terms of the variables molasses and corn steep liquor (equations 02-06), allowing the construction of contour surfaces shown in **Figure 2**.

$$\text{Vol. prod. of car. } (\mu g.L^{-1}): 483{,}41+130{,}97.MEL -103{,}13.MEL^2 - 71{,}84.AMM^2 +31{,}48.MEL.CSL \quad (2)$$

$$\text{Biomass } (g.L^{-1}): 8{,}02 + 1{,}61.MEL – 1{,}69.MEL^2 + 0{,}44.CSL – 1{,}15.CSL^2 \quad (3)$$

$$C/N: 29{,}75 + 8{,}62.MEL^2 – 3{,}96.MEL^2 – 4{,}84.CSL \quad (4)$$

$$\text{Prod. Vol. In car. } (\mu g.L^{-1}.h^{-1}): 4{,}03+0{,}78*MEL – 1{,}19.MEL^2 - 1{,}00.CSL^2 \quad (5)$$

$$\text{Prod. Bio. } (g.L\text{-}1.h^{-1}): 0{,}07 + 0{,}01.MEL – 0{,}02.MEL^2 - 0{,}02.CSL^2 \quad (6)$$

Where: MEL: Sugar cane molasses, CSL: Corn steep liquor.

Table 3: Analysis of variance for the central composite rotational design 2^2

	Sum of squares		**Degrees of freedom**		**Mean square**		**p-value**	
Source of variation	**PVC**	**Biomass**	**PVC**	**Biomass**	**PVC**	**Biomass**	**PVC**	**Biomass**
Regression	193342	36,29	4	4	48335,5	9,07	9,29	8,48
Residual	2609,2	5,34	5	5	5201,84	1,07		
Total	219351,2	41,63	9	9				
	Sum of squares		**Degrees of freedom**		**Mean square**		**p-value**	
Source of variation	**C/N**	**Pro. Vol.**	**C/N**	**Pro. Vol.**	**C/N**	**Pro. Vol.**	**C/N**	**Pro. Vol.**
Regression	867,04	12,66	4	3	216,76	216,76	80,28	23,44
Residual	16,19	1,05	6	6	2,7	2,7		
Total	883,23	13,71	9	9				
	Sum of squares		**Degrees of freedom**		**Mean square**		**p-value**	
Source of variation	**Pro. Bio.**		**Pro. Bio.**		**Pro. Bio.**		**Pro. Bio.**	
Regression	$2{,}83.10^{-3}$		4		$7{,}07.10^{-4}$		11,74	
Residual	$3{,}72.10^{-4}$		6		$6{,}02.10^{-5}$			
Total	$3{,}20.10^{-3}$		9					

PVC = Volumetric production in carotenoids; C/N = The carbon and nitrogen, Prod. Vol. = Volumetric productivity in carotenoids and Prod. Bio. = Biomass productivity. PVC (R: 0,94, $F_{3;\ 6;\ 0,95} = 3{,}52$); Biomass (R: 0,93, $P_{4;\ 5;\ 0,90} = 3{,}52$), C/N (R: 0,99 $P_{4;\ 6;\ 0,90} = 3{,}18$); Pro. Vol. (R: 0,96, $P_{3;\ 6;\ 0,95} = 4{,}92$) e Prod. Bio. (R: 0,94, $P_{4;\ 6;\ 0,95} = 4{,}53$).

Figures 2 A and **2 B** show the contour curve, where it is well-known that one can obtain high production of volumetric carotenoids and biomass using a concentration range 30-50 $g.L^{-1}$ of molasses together with 5.3 to 8.9 $g.L^{-1}$ Corn steep liquor. As for the increase of the carbon and nitrogen of the culture medium one must work with high concentrations of molasses (50 to 58.2 $g.L^{-1}$) and low concentration of corn steep liquor (2.27 to 3.5 $g.L^{-1}$), as seen in **Figure 2 C**.

To have a high production of volumetric carotenoid one must work with 30-42 $g.L^{-1}$ of molasses and 5.3 to 7.7 $g.L^{-1}$ of corn steep liquor (**Figure 2 D**). To achieve high productivity in biomass the concentration of molasses must be 30-42 $g.L^{-1}$ and corn steep liquor 5.9 to 7.7 $g.L^{-1}$ (**Figure 2 E**).

Therefore, to obtain the maximum possible for all responses, 30-50 $g.L^{-1}$ of molasses and 5.3 to 8.9 $g.L^{-1}$ of corn steep liquor are required.

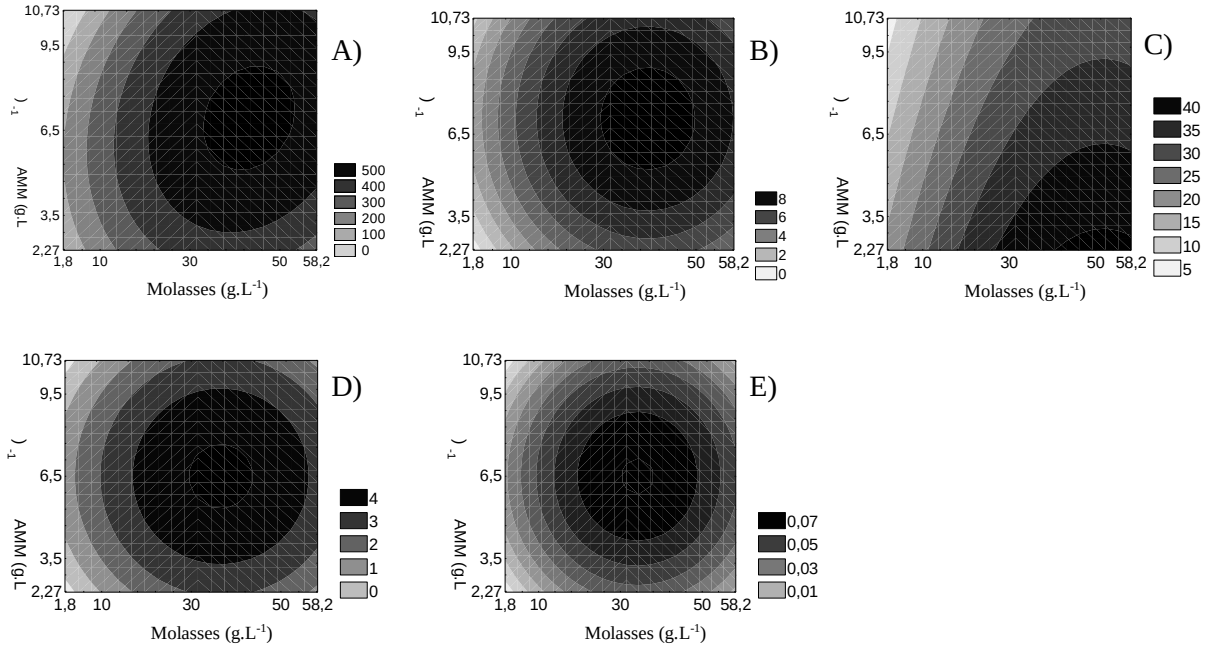


Figure 2: contour Curve for responses volumetric production in carotenoids (A) biomass (B), the C/N (C) volumetric productivity of carotenoid (D) and biomass productivity (E) by the yeast *S. pararoseus*, 25°C, 180 rpm for 168 h with an initial pH of 6. AMM = corn steep liquor

CONCLUSION

The use of 30-50 $g.L^{-1}$ of molasses in combination with 5.3 to 8.9 $g.L^{-1}$ of corn steep liquor obtained a carotenoids yield of 82.1% (500 $\mu g.L^{-1}$) when compared with the lowest experimental result, besides the cellular concentration of 8.12 $g.L^{-1}$, a carotenoid productivity of 4.08 $g.L^{-1}.h^{-1}$ (0.5 $\mu g.g^{-1}.h^{-1}$) and biomass productivity in 0.07 $g.L^{-1}.h^{-1}$ demonstrates the potential of *Sporidiobolus pararoseus* as a source of microbial carotenoids using agroindustrial byproducts.

BIBLIOGRAPHY

AOAC. 2000 – Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 ed. Arlington, Virginia. USA.

Cipolatti EP. 2012. Microbial Carotenoids: Evaluation of antioxidant activity and utilization of agro-industrial byproducts. Rio Grande – RS, 120pag. Dissertation (Postgraduate Engineering and Food Science). School of Chemistry and Food, Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Coelho AR. 2005. Control of *Penicillium expansum* / biodegradation of patulin: chromatographic profile of bioactive compound yeast killer aiming postharvest application. Thesis.Universidade Federal do Paraná, Brasil.

Fonseca RAS., Rafael RS., Kalil SJ., Burkert AV., Burkert JFM. 2011. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. Afr. J. Biotechnol., 10:1165-1171.

Kusdiyantini E., Gaudin P., Goma G., Blanc PJ. 1998. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. Biotechnol. Let., v. 20:929-934.

Michelon M., Borba TM., Ruan SR., Burkert CAV., Burkert JFM. 2012. Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. Food Sci. and Biotechnol., 21:1-8.

Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 31:426-428.

Otero DM. 2011. Bioprospecting of wild yeasts that produce carotenoids. Rio Grande – RS, 114pag. Bioprospecting of wild yeasts That produce carotenoids.). Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Silva MC. 2004. Changes in carotenoid biosynthesis in yeast induced by chemical agents. Thesis (Ph.D. in Food Science), Universidade Estadual de Campinas.

Silva DA. 2009. Maximizing production of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrohous*) using water of rice parboiling. Rio Grande, RS, 92 pag. Thesis (MA in Engineering and Food Science). Universidade Federal do Rio Grande, FURG.
Silva CM. 2010. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* yeast strain NRRL Y-17268: valuation of glycerin (derived from the synthesis of biodiesel) and water to parboiled rice. Rio Grande, RS, 105pag. Thesis (MA in Engineering and Food Science). Universidade Federal do Rio Grande, FURG.
Rodrigues MI., Iemma AF. 2011. Design of Experiments and Optimization processes: a strategy of sequential planning. Campinas: Casa do Pão Editora.
Mendes, GL. 2006. Production of inulinase by Kluyveromyces marxianus in fed-batch process from industrial media pretreated. Campinas – SP, 89pag. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
Valduga E., Valéria A., Treichel H., Luccio M., Júnior AF. 2008. Study of the bio-production of carotenoids by Sporidiobolus salmonicolor (CBS 2636) using pre-treated agro-industrial substrates. J.Chem Technol Biotechnol, 83:1267-12774.

ACKNOWLEDGMENT
CNPq and CAPES for financial support.

Efecto del procesamiento sobre la estabilidad de un producto vegetal (*Cucurbita moschata, Duchesn* ex Poiret) enriquecido con probióticos

Miletti A. E.[1], de Escalada Pla M. F. [2, 3], Flores S. K. [2, 3]

1. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ingeniería.
2. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
3. Miembro del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
sflores@di.fcen.uba.ar

Resumen: El presente trabajo tuvo como objetivos analizar la aptitud de un alimento vegetal (*Cucurbita moschata Duchesne* ex Poiret), procesado con diferentes tratamientos: deshidratado al vacío (S1); deshidratado osmóticamente (S2) y deshidratado osmóticamente y posterior secado al vacío (S3), como matriz soporte de *Lactobacillus casei* y estudiar la viabilidad del probiótico soportado y el efecto de su presencia sobre el color del producto final. Luego de su almacenamiento en bolsas de polipropileno a 18-20ºC por 28 días, los productos obtenidos mostraron una carga de $\approx 10^7$ UFC/g estable, con excepción del S3 que presentó disminuciones de 1 a 3 ciclos log después de 15 días. En cuanto al color, S1 fue más luminoso ($p<0,001$) que S2 y S3 en todo momento. En cuanto al parámetro a*, se observaron disminuciones significativas para el S2 después de 15 días. A través del parámetro b*, pudo observarse que S1 fue el producto más amarillo ($p<0,001$) de todos. Se pudo observar que el efecto de la presencia del probiótico sobre el color de la matriz se evidenció sólo para S1 a través del parámetro b* mientras que sobre los parámetros a* y L* de ese sistema, recién se notaron diferencias a los 28 días de almacenamiento.

Palabras clave: alimento funcional, probióticos, viabilidad de *Lactobacillus casei*, matriz vegetal.

Abstract: this study aimed to analyze the suitability of a vegetable food *(Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret), processed with different treatments: vacuum dehydrated (S1); osmotically dehydrated (S2) and osmotically dehydrated followed by vacuum drying (S3), as a *Lactobacillus casei* support matrix, and to study the viability of the supported probiotic and the effect of its presence on the color of the final product. After storage in polypropylene bags at 18-20° C for 28 days, the obtained products showed a load of $\approx 10^7$ UFC/g stable, except for S3 that presented reductions of 1-3 log cycles after fifteenth days. Regarding the color, S1 showed highest lightness ($p < 0.001$) than S2 and S3 at any time. Regarding a* parameter, significant decreases for S2 were observed after 15 days. It could be seen through parameter b *, that S1 was the greatest yellow product ($p < 0.001$). It could be observed that the probiotic presence effect on the color of the matrix was evidenced only for S1 through parameter b *, while on parameters a * and L * of that system, differences were just noted after 28 days of storage.

Keywords: functional food, probiotics, *Lactobacillus casei* viability, vegetal matrix.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la Organización Mundial de Salud y a la Organización de Alimentos y Agricultura, varios patrones dietarios junto con los hábitos en el estilo de vida constituyen los mayores factores de riesgo modificables para el desarrollo de enfermedades coronarias, cáncer, diabetes de tipo 2, obesidad, osteoporosis y enfermedades periodontales (WHO 2003). En este sentido, la posibilidad de acceder a una mejor calidad de vida a través de una alimentación variada y equilibrada, es un concepto en creciente aceptación y arraigo en las sociedades modernas (Siró *et al*. 2008). En este aspecto, los alimentos funcionales aportan un plus por contener ingredientes que han probado ser beneficiosos para la salud: prebióticos, probióticos, fibra dietaria, aceites de pescado, esteroles de plantas, minerales y compuestos antioxidantes (Acosta 2011). La industria de los alimentos tiene en consideración muchas variables a la hora de desarrollar o rediseñar productos funcionales, tales como la aceptación sensorial, estabilidad, precio, conveniencia, propiedades químicas y funcionales (Granato *et al*. 2010). Se requiere una gran variabilidad de técnicas a fin de satisfacer las necesidades y expectativas en el área de alimentos funcionales (Betoret *et al*. 2011). Los alimentos son mayoritariamente mezclas complejas de macro – y micro- componentes que pueden atrapar el principio activo, modular su liberación o inhibir su actividad (Chen *et al*. 2006; Chen y Subirade, 2007). Es así como la matriz alimentaria en estado crudo y después del proceso y almacenamiento puede tener una

influencia significativa en cuanto a la actividad o liberación de componentes claves. La selección y el desarrollo de un alimento que sea un vehículo apropiado que mantenga el principio activo hasta el momento del consumo y liberación para lograr el efecto fisiológico en el organismo, es un paso importante para el desarrollo exitoso de un alimento funcional (Betoret *et al*. 2011).
Una extensa bibliografía respalda el accionar de los probióticos en cuanto a mantener el equilibrio de la flora intestinal, potenciar el sistema inmunológico (Oelschlaeger 2010) y más recientemente también se ha reportado evidencia del beneficio que estos microorganismos podrían ocasionar sobre el sistema nervioso central (Bravo *et al.* 2011). Los efectos beneficiosos de las bacterias ácido lácticas en la salud y el bienestar humano están documentados en estudios experimentales y clínicos, ofreciendo a los consumidores tres beneficios principales para la salud: la mejora de la salud intestinal, la disminución de colesterol en la sangre y la mejora de los mecanismos de defensa naturales del cuerpo (Betoret *et al.* 2001).
En la actualidad, los alimentos probióticos industriales corresponden, fundamentalmente, a la industria láctea. La intolerancia a la lactosa y el contenido de colesterol de dichos productos lácteos suelen ser ejemplos de los inconvenientes relacionados con el consumo de estos alimentos. Por otro lado, existen pocos datos reportados acerca del enriquecimiento de matrices vegetales con microorganismos probióticos. De esta forma, el interés está puesto en la innovación de tecnologías que permitan obtener alimentos de origen vegetal portadores de cepas probióticas, como así también, en el estudio de las interacciones entre probiótico y tejidos vegetales, y su influencia en la viabilidad y funcionalidad (do Espírito Santo *et al.* 2011).
Se destaca que el desarrollo de alimentos funcionales a partir de tejido de calabaza permitiría aumentar el valor agregado a la producción de frutihortícolas poco explotados a través de procesos biotecnológicos.
Los objetivos del presente trabajo fueron desarrollar un alimento vegetal (calabaza) procesado como matriz soporte de probióticos y estudiar la viabilidad del microorganismo probiótico en la formulación de la matriz vegetal enriquecida, así como los efectos de dicha fortificación sobre el color del producto que los soporta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la calabaza

Como matriz vegetal se utilizó tejido de calabaza (*Cucurbita moschata Duchesne* ex Poiret), previamente lavado, cortado con geometría cilíndrica de 30 mm de diámetro y 10 mm de espesor. Para lograr la textura adecuada, los cilindros fueron escaldados por 8 minutos, y, posteriormente, enfriados en baño de hielo durante 2 minutos. Se reservó una fracción del lote para realizar los controles respectivos a los diferentes procesos, a fin de poder evaluar el efecto de la presencia del probiótico sobre el color del tejido.

Enriquecimiento con probióticos

Los cilindros escurridos restantes, se sumergieron por 20 minutos, a 18-20ºC, en un líquido de impregnación elaborado con solución fisiológica glucosada (0,9% NaCl; 5% glucosa) y conteniendo *Lactobacillus casei* (ATCC 393) con una carga microbiana de 10^8 UFC/ml.

Procesamiento de los sistemas en estudio

Los trozos impregnados con *L. casei* se escurrieron y se fraccionaron en 3 lotes los cuales se sometieron a diferentes tratamientos.
Deshidratado al vacío "Sistema 1 (S1) "
Los cilindros se colocaron en bandejas y fueron sometidos a una deshidratación al vacío *(*presión de 0,011 mbar) por 24 hs (Christ, Alemania).

Deshidratado osmóticamente "Sistema 2 (S2)"
Se realizó la impregnación de los cilindros con sacarosa (26g/100g calabaza), glucosa (37g/100g calabaza), ácido cítrico (0,17g/100 calabaza) y sorbato de potasio (0,11g/100g calabaza), a 18-20ºC. Luego de 24 hs se escurrieron los cilindros.

Deshidratado osmóticamente y posterior secado al vacío "Sistema 3 (S3)"
Primero, los cilindros se impregnaron, de la misma manera que el sistema S2, y luego, fueron sometidos a un proceso de secado al vacío, en las mismas condiciones que el sistema S1.
Sistemas control (SC)
En paralelo se prepararon lotes equivalentes de producto, en ausencia de *L. casei* como sistemas control de cada procesamiento (SC1; SC2 y SC3).

Empaquetamiento y almacenamiento
Todos los sistemas fueron empaquetados en bandejas plásticas cubiertas con bolsas de polipropileno impermeables al vapor de agua y al oxígeno, siendo almacenados a 18-20ºC durante 28 días.

Análisis microbiológico
Estabilidad del Lactobacillus casei
Para evaluar la estabilidad del *L.casei*, se determinó la cantidad de células viables a lo largo del almacenamiento. El recuento se realizó en profundidad a partir de diluciones apropiadas de un homogenato de las muestras, utilizando agar MRS e incubando a 37ºC por 48 hs.

Caracterización físico-química
Actividad de agua (a_w): se midió la actividad de cada sistema con un higrómetro de punto de rocío Aqualab (Italia), previamente calibrado.
Color: para evaluar los cambios en el color se midieron los parámetros CIE L* (Luminosidad: 0 (negro) a 100 (blanco)), a* (rojo/verde: +a (rojo) a -a (verde)) y b* (amarillo/azul: +b (amarillo) a –b (azul)) durante el almacenamiento, para cada sistema, utilizando un colorímetro CM-Modelo 508 d, Minolta, (Japón). Se seleccionó el iluminante D y un ángulo de observador de 2º.

Análisis estadístico
Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por triplicado. Las diferencias entre sistemas se establecieron mediante análisis de la varianza (ANOVA) y el test *a posteriori* LDS, con un nivel de significancia del 95% (Sokal & Rohlf, 1969).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Viabilidad del *L. casei*
Luego de la impregnación con *L. casei*, y antes del procesamiento de cada sistema, el tejido de calabaza registró un recuento aproximado de $1{,}2.10^6$ UFC/g.
Una vez realizado el proceso de deshidratación, la a_w resultante de los sistemas S1, S2 y S3 fue de 0,37; 0,94 y 0,58 respectivamente.
En la **Figura 1** se representa la viabilidad del *L.casei*, soportado en la matriz vegetal, en función del tiempo de almacenamiento, para los sistemas S1, S2 y S3.
Se observa que, desde el inicio y hasta los 15 días de almacenamiento, los sistemas S2 y S3 presentaron un recuento de 10^6 UFC/g de producto, mientras que S1 presentó un recuento de 10^7 UFC/g de producto. Cabe destacar que el procesamiento de S1 provocó una concentración inicial de las UFC/g de producto mayor respecto a los sistemas S2 y S3, debido a la pérdida de agua por el proceso de deshidratación aplicado, y el consecuente aumento de sólidos por gramo de producto.
Luego de 15 días, S3 sufrió una reducción en la concentración de células viables de *L.casei* de 1 a 3 ciclos log, respecto de los sistemas S1 y S2, paulatinamente hasta el final del almacenamiento. El recuento de células probióticas se mantuvo en $10^6 – 10^7$ UFC/g para los sistemas S1 y S2 durante todo el ensayo.

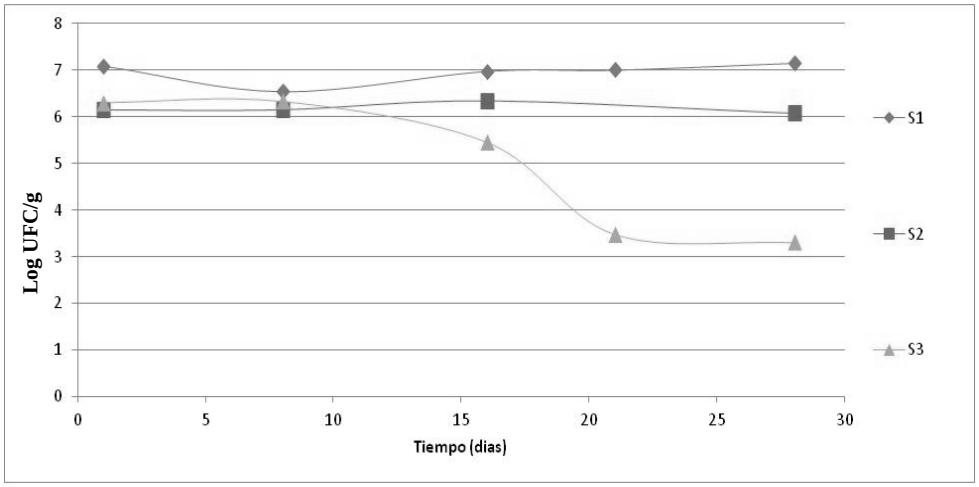


Figura 1: Viabilidad de *L.casei* en función del tiempo de almacenamiento. "Sistema 1 (S1)" Deshidratado al vacío, "Sistema 2 (S2)" Deshidratado osmóticamente, "Sistema 3 (S3)" Deshidratado osmóticamente y posterior secado al vacío.

En la **Tabla 1** se observan los parámetros de color de los sistemas estudiados. Inicialmente, todos los sistemas presentaron valores aproximadamente iguales de a*. Luego de los 15 días de almacenamiento, S2 presentó una disminución significativa de este parámetro. En general, b* tiende a disminuir con el tiempo de almacenamiento, siendo este descenso más notorio y significativo para S2, mientras que S1 fue el producto más amarillo ($p<0,001$) de todos. Varios factores son los responsables de la pérdida de pigmentos y de color durante el procesamiento de los alimentos. Los pigmentos que le otorgan a la calabaza su característico color naranja son, mayoritariamente, α y β-carotenos y licopeno (Seo *et al*. 2005). La caída de los valores de a* y b* para los sistemas señalados anteriormente correspondería, entonces, a una importante degradación de los carotenoides presentes en el tejido de calabaza (Dutta *et al*. 2006). Cuando se compararon los sistemas con sus respectivos controles se pudo observar que el efecto de la presencia del probiótico sobre el color de la matriz se evidenció sólo para S1 a través del parámetro b* mientras que sobre los parámetros a* y L* de ese sistema, recién se notaron diferencias a los 28 días de almacenamiento. Otros factores, tales como la pérdida de agua, condiciones de almacenamiento en cuanto a temperatura y material de empaquetamiento, entre otros, pueden además participar en la pérdida de pigmentos y de color evidenciados durante el ensayo. Allegre *et al*. 2011 estudiaron los cambios en el color en rodajas de manzanas sin inocular e inoculadas con *Lactobacillus rhamnosus* GG y almacenadas en refrigeración durante 28 días. Estos autores reportaron un incremento del parámetro L* y una reducción del parámetro a* durante los primeros 4 días tanto para los sistemas tratados como para los controles, tomando valores desde 73 a 83 y de -2,5 a -3,8 respectivamente. Por otro lado, indicaron que el parámetro b* no sufrió cabios significativos durante el almacenamiento y que tampoco se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 1: Parámetros de color de cilindros de calabaza impregnados con *L.casei.*: "Sistema 1 (S1)" Deshidratado al vacío, "Sistema 2 (S2)" Deshidratado osmóticamente, "Sistema 3 (S3)" Deshidratado osmóticamente y posterior secado al vacío y los respectivos controles sin enriquecimiento del probiótico: "SC1"control para el S1, "SC2"control para el S2, "SC3"control para el S3.

	L*			a*			b*		
	Tiempo (días)								
Sistemas	0	15	28	0	15	28	0	15	28
SC1	75 ± 2	77 ± 2	73 ± 2	20 ± 3	15 ± 3	22 ± 2	86 ± 7	73 ± 15	90 ± 4
S1	73 ± 5	79 ± 1	79 ± 1	17 ± 3	13 ± 2	13 ± 2	102 ± 6	89 ± 4	87 ± 5
SC2	44 ± 1	46 ± 1	49 ± 3	22 ± 2	10 ± 2	6 ± 5	73 ± 1	52 ± 8	37 ± 7
S2	44 ± 1	44 ± 1	50 ± 1	22 ± 3	12 ± 3	6 ± 8	73 ± 1	52 ± 2	35 ± 4
SC3	45 ± 3	38 ± 2	40 ± 5	23 ± 2	25 ± 2	24 ± 1	70 ± 2	60 ± 3	63 ± 3
S3	46 ± 4	39 ± 1	36 ± 2	23 ± 3	25 ± 3	25 ± 1	70 ± 4	64 ± 1	60 ± 2

Cada valor es el promedio y la desviación estándar de por lo menos tres determinaciones.

CONCLUSIONES

El tejido vegetal de calabaza demostró ser una eficiente matriz soporte de *L. casei*. Los resultados arrojados por todos los sistemas procesados muestran una carga de probióticos de alrededor de 10^6-10^7 UFC/g de producto durante los primeros 15 días de almacenamiento. Las muestras que recibieron un tratamiento de deshidratación al vacío presentaron el mayor valor de la carga, el cual se mantuvo aproximadamente constante hasta el final del ensayo (28 días). Este nivel concuerda con los valores promedio que normalmente se encuentran en los productos lácteos comerciales (Betoret *et al*. 2001), lo que pone en evidencia la posibilidad de optimizar y diversificar la producción de alimentos probióticos utilizando como base matrices frutihortícolas.

Los cambios observados en la coloración de los cilindros de calabaza pueden adjudicarse solo en parte a la presencia de probióticos. Los tratamientos efectuados sobre las muestras posteriores a la fortificación con probióticos fueron los mayores responsables en el cambio de coloración observado, posiblemente debido a una degradación de los pigmentos. En este aspecto, debe seguir investigándose para conseguir parámetros de procesos que permitan lograr mejores resultados.

Los datos del presente trabajo contribuyen para la formulación de alimentos funcionales enriquecidos con probioticos de origen no lácteo. Adicionalmente, esto evidencia una prometedora contribución a la optimización de matrices frutihortícolas, a través de la obtención de productos elaborados con mayor valor agregado.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta B. 2011. Alimentos funcionales: ¿funcionan o no? El caso de los probióticos y prebióticos: implicaciones de su consumo en la salud humana. Disponible en:
http://www.agroconsultoraplus.com/vconferencias/funcionales.html

Ahmed J, Shivhare US, Sandhu KS. 2002. Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree. Food Engineering and Physical Properties, 67 (7): 2692-2695.

Ahmed J, Shivhare US, Singh G. 2000b. Chlorophyll and color of green chilli puree as affected by mesh size and temperature. Intern J Food Properties, 4: 305-316.

Alegre I, Viñas I, Usall J, Anguera M, Abadias M. 2011. Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut Apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. Food Microbiology, 28:59-66.

Betoret N, Puente L, Díaz MJ, Pagán MJ, García MJ, Gras ML, Martínez-Monzó J, Fito P. 2001. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. Journal of Food Engineering, 56: 276-277.

Betoret E, Betoret N, Vidal D, Fito P. 2011. Functional foods development: trends and technologies. Trends in Food Science & Technology, 22: 498-508.

Bravo J, Forsythe P, Chew M, Escaravage E, Savignac H, Dinana T, Bienenstock J, Cryan, J. 2011. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. Proceedings of the National Academy of Sciences, 35.

Chen L, Remondetto GE, Subirade M. 2006. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. Trends in Food Science and Technology, 17 (5): 272-283.

Chen L, Subirade M. 2007. Effect of preparation conditions on the nutrient release properties of alginate/whey protein granular microspheres. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 65: 354-362.

do Espírito Santo A, Perego P, Converti A, Oliveira M. 2011. Influence of food matrices on probiotic viability – A review focusing on the fruity bases. Trends in Food Science & Technology, 22:377-385.

Dutta D, Dutta A, Raychaudhuri U, Chakraborty Runu. 2006. Rheological characteristics and thermal degradation kinetics of beta-carotene in pumpkin puree. Journal of Food Engineering, 76: 538-546.

Granato D, Branco GF, Nazzaro F. 2010. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts and products. Comprehensive reviews in food science and food safety, 9, 292-302.

Minguez-Mosquera MI, Jaren-Galan M. 1995. Kinetics of decolouring of carotenoid pigments. J Sci Food Agric, 67: 153-161.

Oelschlaeger T. 2010. Mechanisms of probiotic actions – A review. International Journal of Medical Microbiology, 300:57-62.

Seo JS, Burri BJ, Quan Z, Neidlinger, TR. 2005. Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin. Journal of chromatography A., 1073: 371-375.

Siró I, Kápolna E, Kápolna B, Lugasi A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance — A review. Appetite, 5:456–467.
Sokal RR, Rohlf FJ. 1969. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research (3rd. Edn). WH Freeman, San Francisco, USA.
WHO, 2003. Diet, nutrition and prevention of chronic diseases. WHO technical report series 916. Genova, Suiza. http://www.fao.org/docrep/005/AC911E00.HTM#Contents. (acceso 18/10/2012).

AGRADECIMIENTOS
Universidad de Buenos Aires (UBA), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET), MINCYT (Argentina).

Bioactividad de β-galactosidasa en un ambiente que simula la superpoblación molecular de los alimentos y del quimo.

Ledesma D., Perillo, M.A., Nolan, V.

IIBYT (CONICET-UNC)- ICTA, FCEFyN,UNC
vnolan@efn.uncor.edu

Resumen: El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto de la superpoblación macromolecular (SPM) sobre la cinética de hidrólisis de *o*-nitrofenil galactopiranósido (ONPG) catalizada por β -galactosidasa de *E.coli* (β -Gal). Para esto se aplicaron dos técnicas, espectroscopia UV-Visible (EF) y Calorimetría de titulación isotérmica (ITC), las cuales están basadas en principios físicos diferentes. La condición de SPM se simuló con disoluciones de polietilenglicol PM 6000 (PEG^{6000}) a distintas concentraciones (0 a 35 % P/V). Los resultados arrojados por ambas técnicas (EF e ITC) no mostraron diferencias significativas, permitiéndonos: a) validar el uso del ITC para estudios cinéticos de reacciones catalizadas por enzimas en condiciones de SPM y b) aceptar que la SPM no interfirió sobre el comportamiento espectroscópico del producto de la reacción estudiada. El principal hallazgo fue que la velocidad de reacción (V_{max}) no se vio afectada, mientras que la afinidad de la enzima por su sustrato (K_M) sufrió una disminución significativa (K_M aumentó de 0,14 a 1 mM para 0 y 35 % P/V PEG^{6000}, respectivamente) a medida que aumentó la concentración del agente superpoblante. Esta disminución en la afinidad a altas concentración de PEG^{6000} podría deberse a la restricción difusional que impone la alta densidad molecular presente en estas condiciones. Este resultado es importante para el diseño de sistemas terapéuticos de sustitución enzimática.

Palabras clave: β-Galactosidasa, cinética enzimática, superpoblación molecular, Calorimetría de titulación isotérmica**.**

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of macromolecular crowding (MC) on the kinetics of hydrolysis of *o*-nitrophenyl galactopyranoside (ONPG) catalyzed by β-Gal. Two techniques based on different physical principles, UV-visible absorption spectroscopy (AS) and Isothermal Titration Calorimetry (ITC), were applied. MC was simulated with solutions of polyethylene glycol at different concentrations. The results obtained by both techniques (AS and ITC) were not significantly different from one another, allowing us to: a) validate the use of ITC for kinetic studies of enzymtically catalized reactions in MC conditions and b) to accept that MC did not interfer with the spectroscopic behavior of the reaction product. The main finding was that, upon rising the MC level, V_{max} was not affected while the affinity of the enzyme for the substrate (K_M) suffered a significant decrease . The latter may be due to diffusional restrictions imposed by the high molecular density in MC conditions. This result is relevant for the design of enzymatic substitution therapeutic systems.

Keywords: β -Galactosidase, enzymatic kinetic, molecular crowding, Isothermal Titration Calorimetry

INTRODUCCIÓN

La β-galactosidasa (β-Gal) es una enzima ampliamente distribuida, que cataliza la hidrólisis de un enlace β-galactosídico terminal presente en carbohidratos, glicolípidos, glicoproteínas y glicosaminoglicanos (Tanaka et al. 2005). La β -Gal conocida como lactasa-floricina-hidrolasa, LPH o lactasa, cataliza la hidrólisis de lactosa, el azúcar de la leche, en glucosa y galactosa. Ésta se encuentra localizada en las células epiteliales del intestino delgado y su ausencia o baja actividad produce la denominada "intolerancia a la lactosa", enfermedad que se manifiesta con problemas gastrointestinales, cólicos e hinchazón abdominal. Una forma de revertir estos efectos es evitando el consumo de productos lácteos (pudiendo incurrir en algún déficit alimentario) o utilizando productos previamente deslactosados (lo cual puede originar cambios en las características organolépticas de estos alimentos).

Otra forma de mitigar esta intolerancia sería por medio del consumo de alimentos que contuvieran incorporada a la enzima en forma encapsulada e inactiva en el alimento, en la boca y en el estómago pero que, al liberarse en el intestino, pudiera expresar su actividad. Ésta última opción genera la necesidad de diseñar sistemas de encapsulamiento y activación para lo cual es necesario conocer el

comportamiento de la enzima en sistemas que se caracterizan por su superpoblación macromolecular (SPM) como lo son los alimentos y el quimo, la masa de alimentos digeridos que se transporta por el tubo digestivo.

Los sistemas con SPM se caracterizan por poseer alta concentración de diferentes tipos de macromoléculas que en conjunto ocupan una importante fracción del volumen total (Zimmerman and Minton 1993). En estas condiciones, las moléculas son sometidas a restricciones estéricas y difusionales que afectan sus propiedades. El efecto de la SPM sobre las velocidades de reacciones bioquímicas es complejo ya que mientras que las velocidades de difusión disminuyen (Luby-Phelps 2000), la actividad termodinámica de los distintos componentes aumenta (Zimmerman and Minton 1993, Minton 1995). El resultado dependerá de la naturaleza de cada reacción (Ellis 2001). La teoría de volumen de exclusión predice que la superpoblación molecular tendrá efecto sobre el plegamiento de la proteína estabilizando el estado nativo (Minton 1995, Zimmerman and Minton 1993). Así, la actividad de una enzima puede entonces estar afectada por cambios en su conformación debidos a la superpoblación molecular. Los ambientes superpoblados se caracterizan por presentar grandes superficies en contacto con el solvente, cuya estructura se ve afectada (Clop, Perillo and Chattah 2012). Esto puede modificar el plegamiento de la proteína y, por medio de ese mecanismo, la actividad enzimática (Matsue and Miyawaki 2000). La estructura del agua además puede modificar la cinética de una enzima por afectar la interacción hidrofóbica enzima-sustrato.

La mayoría de las metodologías utilizadas para caracterizar la cinética de una reacción catalizada por enzima se basan en la utilización de algún método espectroscópico que permita visualizar un producto artificial coloreado de la reacción (Wallenfels and Malhota 1961), en la cuantificación de los productos por métodos cromatográficos (Atanasov et al. 2005) e inclusive en la cuantificación de los productos de reacción midiendo la actividad de otra enzima sobre esos productos (Marrakchi et al. 2008). Este tipo de cuantificaciones pueden resultar muy imprecisas y/o engorrosas si se utilizan sistemas SPM como medio de reacción. (Olsen 2006). La calorimetría de titulación isotérmica (ITC su sigla en inglés, Isothermal Titration Calorimetry) mide el calor asociado con una dada reacción química (Freire, Mayorga and Straume 1990). Prácticamente todas las reacciones químicas ocurren con la toma o liberación de calor; la velocidad de reacción catalizada por una enzima es proporcional a este flujo de calor, siendo así fácilmente cuantificable por ITC (Todd and Gomez 2001, Olsen 2006). Otra ventaja, es que se podría utilizar el sustrato natural de la enzima (lactosa en este caso), debido a que no se necesita "detectar" los productos de la reacción.

Los objetivos del presente trabajo fueron: i) investigar el efecto de la superpoblación macromolecular sobre la cinética de hidrólisis de *o*-nitrofenil galactopiranósido (ONPG) catalizada por β -galactosidasa de *E.coli* (β-Gal); ii) comparar los datos de hidrólisis de ONPG catalizada por β -Gal obtenidos por espectroscopia UV-Visible (EF) y por ITC, para poder validar la técnica de ITC para estudiar la cinética de enzimas en condiciones de SPM en general y la aplicabilidad de la EF en este sistema en particular.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Materiales

Se utilizó β-Gal de *E. coli* comercializada por Sigma Co., Polietilenglicol PM 6000 (PEG^{6000}) como agente superpoblante y *o*-nitrophenyl-β-D-galactopiranósido (ONPG) como sustrato. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Métodos

Determinación de la actividad enzimática por métodos espectroscópicos

La actividad de β-Gal se determinó por el método de Wallenfels y Malhota (Wallenfels and Malhota 1961). El sistema de incubación contuvo la enzima, buffer fosfato 0,1 M pH 6,8 y ONPG. Se incubó durante 10 min. a 37ºC. La reacción se detuvo por el agregado de NaOH 0.2 M. El producto formado (ONP) se cuantificó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 420 nm. La ecuación de Michaelis-Menten se ajustó, por el método de los cuadrados mínimos, a los datos experimentales obtenidos a diferentes concentraciones de PEG^{6000} para determinar el valor de los parámetros cinéticos.

Determinación de la actividad enzimática por ITC

Se determinaron por ITC (Bianconi 2003) los parámetros cinéticos de la hidrólisis de ONPG catalizada por β -Gal, así como la función termodinámica de estado ΔH a distintas concentraciones de PEG6000. La variable

experimental observable por ITC es el flujo de calor (dQ/dt) que se toma o libera durante una reacción. Este flujo es proporcional a la velocidad de la reacción (v). Para poder calcular la velocidad es necesario conocer la entalpía de la reacción (ΔH_r) y el volumen de la celda (V). El cambio en la entalpía se calcula midiendo el calor total y el número total de moles de sustrato convertidos en producto (n_{sub}).

$$\Delta H_r = \frac{1}{n_{sub}} \int_{t=0}^{t=\infty} \frac{dQ}{dt} dt \quad (1)$$

La velocidad de la reacción se calcula entonces como

$$v = \frac{1}{V \Delta H_r} \frac{dQ}{dt} \quad (2)$$

La concentración de sustrato en función del tiempo se calcula usando el calor integrado en función del tiempo

$$[sub](t) = [sub]_{t=0} - \frac{\int_{t=0}^{t} \frac{dQ}{dt} dt}{\Delta H_r V} \quad (3)$$

Usando (2) y (3) es posible calcular la velocidad de reacción y la concentración de sustrato en función del tiempo y determinar parámetros cinéticos ajustando a una curva de Michaelis-Menten (Todd and Gomez 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de los parámetros cinéticos para la hidrólisis de ONPG catalizada por β-Gal por espectroscopia de absorción UV-Vis

Se determinó la actividad de β-Gal en la reacción de hidrólisis de ONPG y se cuantificó el producto obtenido, ONP, por espectrofotometría UV-Visible midiendo la absorbancia a 420 nm. Se graficó la actividad de la enzima en función de la concentración de sustrato (ONPG) para las distintas condiciones de superpoblación molecular (0, 15, 25 y 35 % PEG^{6000}). Los resultados se muestran en la figura 1:

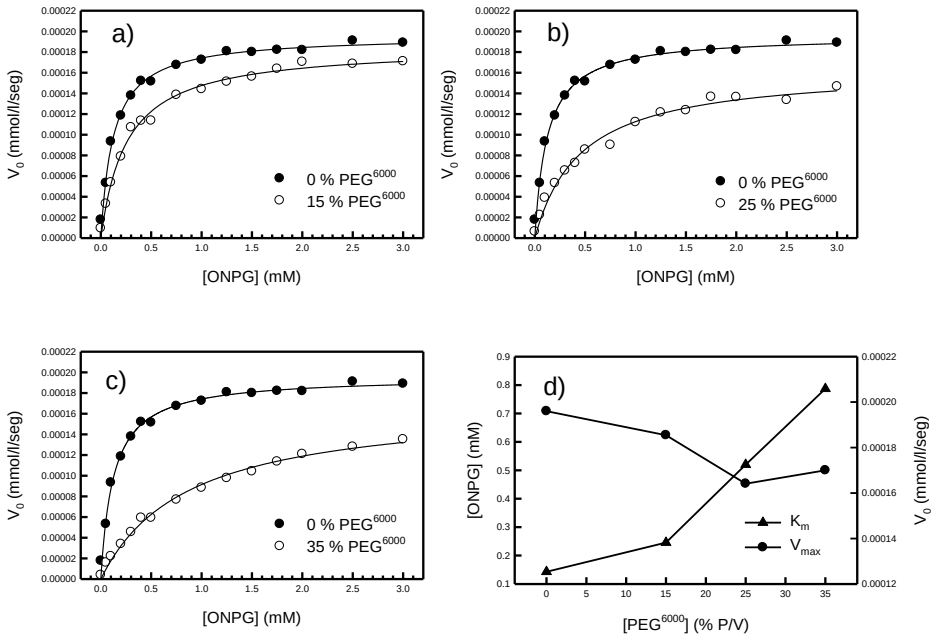


Fig. 1. Efecto del PEG^{6000} sobre la cinética de hidrólisis de ONPG catalizada por β-Gal: a), b) y c) corresponden a curvas de sustrato a concentraciones crecientes de PEG^{6000}; d) efecto del PEG^{6000} sobre los parámetros cinéticos (V_{max} y K_M) de la hidrólisis de ONPG catalizada por β-Gal, Los puntos corresponden a la media ± s.e.m. de triplicados. Las líneas representan el ajuste de la ecuación de Michaelis-Menten

La figura 1 muestra el comportamiento de la enzima a distintas concentraciones de agente superpoblante. A partir de los gráficos obtenidos, se calcularon los parámetros cinéticos K_M y V_{max} de la reacción de hidrólisis. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 1:

Tabla 1. Representación de los valores obtenidos para los parámetros cinéticos por medio de espectroscopía UV-Visible.

[PEG$_{6000}$] (%P/V)	**Sustrato**	**Espectroscopia UV-Visible**	
		K_M (mM)	**V_{max} (mmol/l/seg)**
0	ONPG	0,14 ± 0,01	0,00020±0,00001
15	ONPG	0,25 ± 0,02 [b]	0,00019±0,00001 [a]
25	ONPG	0,52 ± 0,06 [b]	0,00017±0,00001 [a]
35	ONPG	1,0 ± 0,2 [b]	0,00018±0,00001 [a]

Los valores representados son un promedio de todos los experimentos realizados para cada una de las condiciones estipuladas. El número de valores tomados para el cálculo de los distintos parámetros cinéticos fue de 12. En la Tabla se representan los valores promedio con su respectivo error. [a] diferencias no significativas respecto al control; [b] diferencias significativas respecto al control (Test post-hoc LSD)

Como puede observarse en la Tabla 1, a medida que aumenta la concentración de agente superpoblante ocurre una disminución en la afinidad enzima-sustrato (aumenta K_M). Este efecto podría deberse a una dificultad del sustrato para acceder a la enzima debido a que su difusión se encuentra dificultada por la SPM. Se observó también que a medida que la concentración de PEG^{6000} aumenta, la V_{max} de la reacción se mantuvo prácticamente constante.

Determinación de los parámetros cinéticos para la hidrólisis de ONPG catalizada por β-Gal utilizando Calorimetría de Titulación Isotérmica.

Cálculo del ΔH_{app} de reacción

Tal como se describió en la sección Materiales y Métodos, para determinar el ΔH_{app} de la reacción de hidrólisis de ONPG, se realizó una única inyección de sustrato a la celda de muestra, que en este caso contiene la enzima, y se dejó actuar un tiempo suficientemente largo como para que la reacción se completara. La curva obtenida en un experimento de este tipo se muestra en el panel izquierdo de la figura 2, la cual muestra el flujo de calor liberado (reacción exotérmica) en función del tiempo. Integrando el área sobre la curva se obtiene el calor total de la reacción de acuerdo a la ecuación 2.

Para asegurarnos que no ocurra inhibición por producto, se realizó una segunda inyección de sustrato y se dejó actuar. Un experimento de este tipo es mostrado como un inserto en el panel izquierdo de la figura 2. Como puede observarse, el calor obtenido en ambas inyecciones es el mismo, lo cual nos indica que este tipo de inhibición no estaría presente.

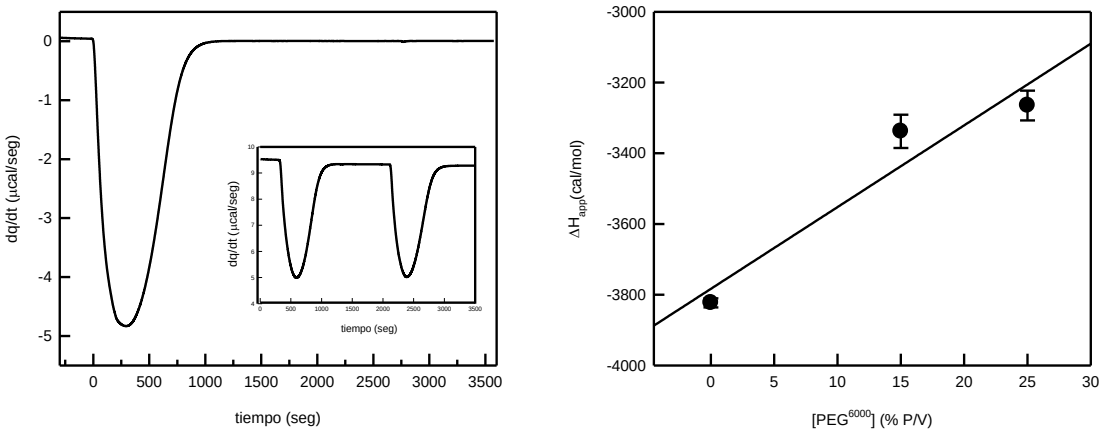


Fig.2. Panel derecho: calor liberado en función del tiempo en un experimento de una inyección. Como inserto en este panel se muestra un experimento que se realiza para descartar inhibición por sustrato (ver texto). Panel izquierdo: ΔH_{app} de la reacción de hidrólisis de ONPG catalizada por β-Gal en función de la concentración de agente superpoblante PEG^{6000}.

Se determinaron los valores de ΔH_{app} de la hidrólisis de ONPG catalizada por β-Gal para las distintas condiciones de SPM. Los datos obtenidos para las distintas concentraciones de PEG^{6000} se muestran en el panel derecho de la figura 2 y se resumen en la Tabla 2:

Tabla 2. Representación de los valores obtenidos de ΔH_{app} para las distintas condiciones de superpoblación en la reacción de hidrólisis de ONPG catalizada por β-Gal.

[PEG^{6000}] (% P/V)	**ΔH_{app} (cal/mol)**
0	-3823±13
15	-3338±47
25	-3261±42
35	-------

Los valores representados fueron obtenidos a partir del promedio de 5 experimentos para cada una de las condiciones estipuladas. Los resultados para todos los casos coincidieron en valores negativos de ΔH, lo cual indica que este cambio entálpico corresponde a una reacción exotérmica, en donde en el transcurso de la reacción se produjo una liberación de calor por parte del sistema.
Se observó que a medida que la concentración de agente superpoblante fue mayor, el cambio entálpico disminuyó (el ΔH_{app} de la reacción fue tomando valores cada vez menos negativos). Para el caso en que la concentración de PEG^{6000} fue de 35% no se muestran valores debido a que los resultados obtenidos no fueron confiables, ya que no se encontró reproducibilidad en los perfiles de las curvas de calor en función del tiempo.

Determinación de los parámetros cinéticos K_M y V_{max} para la reacción de hidrólisis de ONPG catalizada por β-Gal

Se realizaron experimentos de múltiple inyección por Titulación Calorimétrica Isotérmica a fines de obtener los parámetros cinéticos, K_M y V_{max} de la reacción de hidrólisis de ONPG catalizada por β-Gal. El panel superior de la Figura 3 muestra los datos obtenidos en ausencia de PEG^{6000}. El flujo de calor medido (dQ/dt) se grafica en función del tiempo. La entalpía molar de la reacción, valor necesario para el cálculo de la velocidad de reacción fue determinada en un experimento independiente de una inyección (inserto en panel superior de la Figura 3).
Los datos obtenidos en experimentos de múltiples inyecciones como el mostrado en la Figura 3 se convierten en velocidad de reacción, *v*, usando las ecuaciones 3 y 4 (ver sección Materiales y Métodos). La velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato se muestra en el panel inferior de la Figura 3. El ajuste de la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 5) se muestra como una línea sólida.

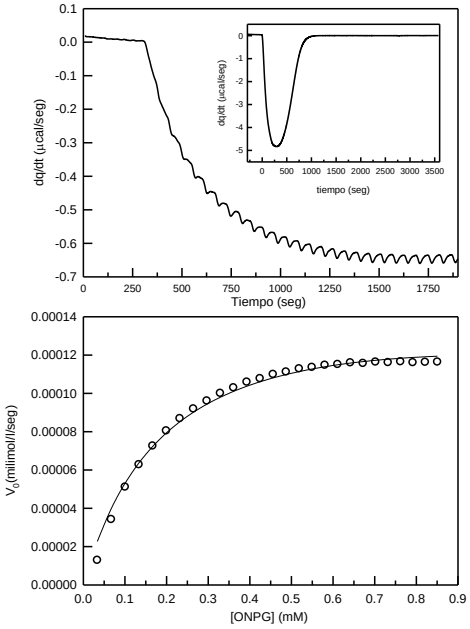


Fig. 3. El panel superior muestra los datos medidos por ITC para la titulación de β-Gal con ONPG en buffer fosfato pH 6,8 a 37ºC. Para la determinación del ΔH_{app} se realizó un experimento de una sola inyección. Los datos de este experimento se muestran como inserto en el panel superior. El panel inferior representa la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato calculada a partir de los datos del panel superior (círculos). La línea sólida representa el ajuste de los datos experimentales a una cinética michaeliana.

El mismo tipo de experimentos y análisis se realizaron para distintas concentraciones de agente superpoblante. Los parámetros cinéticos obtenidos para las distintas condiciones se resumen en la Tabla 3:

Tabla3. Representación de los resultados obtenidos por Titulación Calorimétrica Isotérmica para la Hidrólisis de ONPG catalizada por β-Gal.

[PEG_{6000}] (% P/V)	**Sustrato**	**ITC**	
		K_M (mM)	**V_{max} (mmol/l/seg)**
0	ONPG	0,157 ± 0,007	0,000158 ± 0,000004
15	ONPG	0,30 ± 0,03 [b]	0,00021 ± 0,00002 [a]
25	ONPG	----------	----------
35	ONPG	----------	----------

[a] diferencias no significativas respecto al control; [b] diferencias significativas respecto al control (Test post-hoc LSD).

Los valores que se muestran son un promedio de los resultados de 10 ensayos. Como se mencionó anteriormente, no se pudieron obtener datos confiables para las mayores concentraciones de agente superpoblante utilizado. Para la condición 25% PEG^{6000}, si bien había sido posible medir el ΔH_{app} de la reacción de hidrólisis, no pudieron obtenerse resultados reproducibles en experimentos de múltiples inyecciones que permitieran calcular los parámetros cinéticos en esta condición. Esto podría ser debido a que en los experimentos para determinar ΔH_{app}, la concentración de enzima que se utiliza es mucho mayor, y por lo tanto el calor liberado en la reacción es más grande que en los experimentos de múltiples inyecciones, en los cuales es indispensable utilizar una baja concentración de enzima de modo que en cada inyección el sustrato consumido sea el mínimo posible. Debido a esto, los errores en las mediciones que introduce la alta concentración de superpoblante, serían despreciables en el caso de los experimentos de una inyección, pero no en los de múltiples inyecciones.

Comparación de los datos obtenidos por Espectroscopia UV-Visible y por Titulación Calorimétrica

Uno de los objetivos del presente trabajo era comparar los datos de hidrólisis de ONPG catalizada por β-Gal obtenidos por espectroscopia UV-Visible con aquellos que se obtienen por Calorimetría de Titulación

Isotérmica. Los datos obtenidos por ambas metodologías se resumen para un mejor entendimiento en la Tabla 4:

Tabla 4. Comparación del ajuste a una cinética michaeliana de los datos experimentales obtenidos por espectroscopia UV- Visible y por ITC.

PEG_{6000}	**Sustrato**	**UV- Visible[a]**		**ITC[a]**	
		K_M (mM)	**V_{max} (mmol/l/seg)**	**K_M (mM)**	**V_{max} (mmol/l/seg)**
0 %	ONPG	0,14 ± 0,01	0,00020±0,00001	0,157 ± 0,007	0,000158 ± 0,000004
15 %	ONPG	0,25 ± 0,02	0,00019±0,00001	0,30 ± 0,03	0,00021 ± 0,00002
25 %	ONPG	0,52 ± 0,06	0,00017±0,00001	----------	----------
35 %	ONPG	1,0 ± 0,2	0,00018±0,00001	----------	----------

Los valores mostrados corresponden a la media ± sem de 10 determinaciones. [a]No hay diferencias significativas entre técnicas (ANOVA P< 0.00001)

Como puede observarse, a diferencia de lo que se esperaba, por espectrofotometría UV-Visible pudo medirse la cinética a concentraciones elevadas de agente superpoblante, lo que no pudo llevarse a cabo con éxito mediante ITC.

En cuanto a los valores de los parámetros cinéticos obtenidos por ambas metodologías, se observa lo que se describe a continuación. El valor de K_M mostró la misma tendencia para ambas técnicas: una disminución en la afinidad enzima-sustrato (aumento de K_M) a medida que la concentración de agente superpoblante aumenta. Si bien los valores de K_M para cada condición de PEG^{6000} fueron levemente superiores cuando se calcularon a partir de datos de ITC con respecto a los obtenidos por espectrofotometría UV-Visible, el análisis estadístico mostró que estas diferencias no fueron significativas.

Este efecto de la SPM sobre la afinidad de la enzima por el sustrato podría ser debido al impedimento difusional que la presencia de la alta concentración de moléculas impone al sustrato. Esto también podría deberse a cambios sutiles que pueden ocurrir en la conformación de la enzima, y que pueden explicar que esta exhiba una menor afinidad por el ONPG. Estudios de dicroísmo circular realizados en nuestro laboratorio muestran que la enzima sufre un leve cambio en su estructura conformacional cuando es sometida a concentraciones crecientes de PEG^{6000}.

En cuanto a los valores de V_{max}, por ambas técnicas se encontró que este parámetro no mostró variaciones estadísticamente significativas debidas al aumento en la concentración de PEG^{6000}.

Las diferencias entre los valores tanto de K_M como de V_{max} encontrados por ambas técnicas no fueron estadísticamente significativas. Estas diferencias son similares a las encontradas con estas dos metodologías por Henzler *et al*. estudiando la actividad de enzimas inmovilizadas (Henzler, Haupt and Ballauff 2008).

Finalmente, el efecto de la SPM sobre la afinidad de la interacción enzima-sustrato debe ser tomada en cuenta a la hora de desarrollar sistemas terapéuticos de sustitución enzimática para el tratamiento por vía oral.

BIBLIOGRAFÍA

Atanasov, V., V. Bardarov, B. Aleksiev & M. Mitewa (2005) Vipoxin specificity studied by gas chromatographic determination of enzymatic reaction products. Influence of Ca2+, Mg2+ and Sr2+. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases,* 11**,** 350-360.

Bianconi, M. L. (2003) Calorimetric Determination of Thermodynamic Parameters of Reaction Reveals Different Enthalpic Compensations of the Yeast Hexokinase Isozymes. *Journal of Biological Chemistry,* 278**,** 18709-18713.

Clop, E. M., M. A. Perillo & A. K. Chattah (2012) 1H and 2H NMR Spin Lattice Relaxation Probing Water: PEG Molecular Dynamics in Solution. *The Journal of Physical Chemistry B,* 116**,** 11953-11958.

Ellis, R. J. (2001) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends in Biochemical Sciences,* 26**,** 597-604.

Freire, E., O. L. Mayorga & M. Straume (1990) Isothermal titration calorimetry. *Analytical Chemistry,* 62**,** 950A-959A.

Henzler, K., B. r. Haupt & M. Ballauff (2008) Enzymatic activity of immobilized enzyme determined by isothermal titration calorimetry. *Analytical Biochemistry,* 378**,** 184-189.

Luby-Phelps, K. (2000) Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int Rev Cytol,* 192**,** 189-221.
Marrakchi, M., S. V. Dzyadevych, F. Lagarde, C. Martelet & N. Jaffrezic-Renault (2008) Conductometric biosensor based on glucose oxidase and beta-galactosidase for specific lactose determination in milk. *Materials Science and Engineering: C,* 28**,** 872-875.
Matsue, S. & O. Miyawaki (2000) Influence of water activity and aqueous solvent ordering on enzyme kinetics of alcohol dehydrogenase, lysozyme, and [beta]-galactosidase. *Enzyme and Microbial Technology,* 26**,** 342-347.
Minton, A. P. (1995) Confinement as a determinant of macromolecular structure and reactivity. II. Effects of weakly attractive interactions between confined macrosolutes and confining structures. 68**,** 1311-1322.
Olsen, S. N. (2006) Applications of isothermal titration calorimetry to measure enzyme kinetics and activity in complex solutions. *Thermochimica Acta,* 448**,** 12-18.
Tanaka, S., S. Igarashi, S. Ferri & K. Sode (2005) Increasing stability of water-soluble PQQ glucose dehydrogenase by increasing hydrophobic interaction at dimeric interface. *BMC Biochemistry,* 6**,** 1.
Todd, M. J. & J. Gomez (2001) Enzyme Kinetics Determined Using Calorimetry: A General Assay for Enzyme Activity? *Analytical Biochemistry,* 296**,** 179-187.
Wallenfels, K. & O. P. Malhota (1961) Galactosidases. *Adv Carbohydr Chem,* 16**,** 239-98.
Zimmerman, S. B. & A. P. Minton (1993) Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu Rev Biophys Biomol Struct,* 22**,** 27-65.

Interesterificación enzimática de aceite de soja: estudio de la reacción química de migración

Pacheco C., Crapiste G.H., Carrín M.E.

PLAPIQUI (UNS-CONICET), Bahía Blanca, Argentina.
mcarrin@plapiqui.edu.ar

Resumen: La interesterificación entre aceites y grasas permite obtener productos grasos semisólidos con características fisicoquímicas y/o nutricionales distintivas. La interesterificación enzimática llevada a cabo con lipasas *sn*-1,3 específicas permitiría mantener invariable el patrón de ácidos grasos de la posición *sn*-2 de los triglicéridos originales, hecho que incorporaría un valor nutricional adicional al producto. Sin embargo, existe evidencia que indicaría que esta condición podría no cumplirse, aún utilizando lipasas comprobadas como *sn*-1,3 específicas. En este trabajo se estudió la reacción de interesterificación entre aceite de soja y el mismo totalmente hidrogenado, catalizada por lipasas *sn*-1,3 específicas inmovilizadas comerciales (Lipozyme RM IM y TL IM). Mediante el análisis de la composición de los productos de reacción se comprobó la ocurrencia del fenómeno de acil migración. En particular, se concluyó que Lipozyme TL IM posee un efecto acelerador de la misma y que un aumento en la concentración de biocatalizador y una mayor proporción de ácidos grasos insaturados también promovieron dicho fenómeno. Por el contrario, el agregado de hexano, en combinación con una disminución de la temperatura, disminuyeron su desarrollo. Finalmente, la temperatura, evaluada sobre muestras interesterificadas en presencia de hexano, mostró una correlación positiva con la velocidad de acil migración.

Palabras clave: interesterificación, lipasas, Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM, especificidad *sn*-1,3, acil migración.

Abstract: The interesterification between oils and fats permits to obtain semisolid products with distinctive physicochemical and/or nutritional characteristics. The enzymatic interesterification performed with *sn*-1,3 specific lipases would permit to maintain unaltered the *sn*-2 fatty acid profile of the original triglycerides, increasing the nutritional value of the product. However, there is evidence indicating that this condition could be unfulfilled, even making use of proven *sn*-1,3 specific lipases. In this work, the interesterification between soybean oil and the same one fully hydrogenated, catalyzed by commercial immobilized *sn*-1,3 specific lipases (Lipozyme RM IM y TL IM) was studied. Through the analysis of the composition of the reaction products the occurrence of acyl migration reaction was demonstrated. In particular, Lipozyme TL IM showed an accelerating effect over this reaction, as well as the biocatalyst concentration and the unsaturated fatty acids concentration. On the contrary, the addition of hexane, in combination with a decrease in temperature, reduced the extent of development of the reaction. Finally, the reaction temperature, evaluated in presence of hexane, showed a positive correlation with the acyl migration reaction rate.

Keywords: interesterification, lipases, Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM, *sn*-1,3 specificity, acyl migration.

INTRODUCCIÓN

La posición en la cual se encuentran esterificados los ácidos grasos en la molécula de triglicérido (TAG) juega un papel crucial, tanto en la funcionalidad de los productos grasos como en la forma en que dichos residuos acilo se metabolizan al ser ingeridos. En cuanto a sus implicancias nutricionales, éstas se encuentran relacionadas con la actividad de la lipasa pancreática, cuya acción en el organismo consiste en hidrolizar los ácidos grasos de las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 durante el proceso de digestión de los triglicéridos (Ray y Bhattacharyya 1995). El destino metabólico de los ácidos grasos retenidos en la posición *sn*-2, el cual depende del largo de la cadena carbonada de los mismos, es diferente al de los ácidos grasos liberados. Los aceites y grasas naturales de origen vegetal son ricos en ácidos grasos insaturados (principalmente esenciales) en la posición central del glicerol, mientras que los saturados se ubican generalmente en las posiciones externas del mismo (Ray y Bhattacharyya 1995).

En el caso de la interesterificación enzimática orientada a la obtención de productos grasos con propiedades funcionales mejoradas utilizando lipasas *sn*-1,3 específicas, la elección de este tipo de enzimas se basa principalmente en la intención de mantener inalterado el perfil acídico de la posición *sn*-2 de los sustratos

naturales. Diversas publicaciones científicas indican que las lipasas utilizadas en el presente trabajo pueden considerarse estrictas respecto a su acción exclusiva sobre las posiciones *sn*-1 y -3 del glicerol (Ferrari et al. 1997, Du et al. 2005, Rodriguez et al. 2008, Wang et al. 2008, Fernandez-Lafuente 2010).

Este objetivo, así como también el rendimiento de la reacción, puede verse amenazado por un mecanismo no enzimático conocido como *acil migración*. En las reacciones de interesterificación este fenómeno espontáneo se presenta debido a la aparición de glicéridos parciales, especialmente diglicéridos (DAG) (Xu et al. 1998). La acil migración en este grupo de glicéridos consiste en la isomerización de los 1(3),2-DAG, generados por las lipasas *sn*-1,3 específicas, a la forma termodinámicamente más estable de 1,3-DAG. La fuerza impulsora principal para esta reacción radica en un efecto estérico. El grupo éster en la posición *sn*-2 del 1(3),2-DAG presenta mayores interacciones con el grupo éster adyacente en posición *sn*-1(3) y con el hidroxilo en posición *sn*-3(1) que los correspondientes al 1,3-DAG. Por otro lado, este efecto es parcialmente contrarrestado por la atracción entre las cadenas de ácidos grasos no polares debido a fuerzas de tipo van der Waals (Serdarevich 1967). La relación de equilibrio 1(3),2-DAG:1,3-DAG depende del grado de insaturación de los grupos acilo, así como también del largo de sus cadenas carbonadas (Serdarevich 1967, Laszlo et al. 2008). Para el caso de DAG de cadena larga se han reportado valores de porcentaje de 1,3-DAG respecto al total de DAG de 56% para la acil migración en 1,2-dipalmitina (Kodali et al. 1990); sin embargo el rango generalmente aceptado es de 60 - 70% (Freeman y Morton 1966, Serdarevich 1967, Xu et al. 1998, Laszlo et al. 2008). Para los monoglicéridos (MAG), esta relación aumenta considerablemente, siendo de aproximadamente 1:9 (2-MAG:1(3)-MAG) debido a la ausencia de compensación del efecto estérico por parte de las fuerzas de van der Waals mencionadas (Boswinkel et al. 1996).

La reducción en el rendimiento de la reacción como consecuencia de la acil migración de DAG se produce debido a que la enzima *sn*-1,3 específica no es capaz de reesterificar un grupo acilo en la posición *sn*-2, aumentando en principio el contenido de 1,3-DAG en el medio de reacción.

Existen diversos factores que pueden afectar la acil migración. La presencia de ácidos o bases en el medio catalizarían la reacción. En el caso de las reacciones de interesterificación, los ácidos grasos podrían ejercer este efecto; sin embargo, al tratarse de ácidos débiles su efecto sería mínimo (Xu et al. 1998). Por otro lado, existen estudios contradictorios con respecto al efecto del agua. Oda et al. (2005) y Kaieda et al. (1999) encontraron que el contenido de agua aceleraba la acil migración en reacciones de metanólisis de aceites vegetales. Sin embargo, Xu et al. (1998) aseguran que, en medios libres de solvente, el agua no induce la migración, alegando que los efectos reportados por otros autores probablemente se deban a diferentes niveles de DAG generados a diferentes contenidos de agua. Existe controversia también respecto al rol del solvente en la acil migración. Xu et al. (1998) indicaron que los solventes no polares aceleraban la migración, referenciando un trabajo de Goh et al. (1993) en el que se analizó el efecto del agregado de dos solventes no polares, hexano y dietil éter, en la transesterificación de manteca de cacao. Estos últimos autores concluyeron que la presencia de hexano en el medio de reacción produjo un aumento significativo del fenómeno de acil migración. Sin embargo, dicha conclusión surgió de la comparación de ambos sistemas, sin reportar datos respecto al comportamiento que tendrían los mismos en medios libres de solvente. Más aún, en un trabajo posterior de Xu (Yang et al. 2005) se arriba a la conclusión que el hexano podría inhibir la acil migración en reacciones de acidólisis de tripalmitina con ácido linoleico conjugado y ácido cáprico.

A diferencia de los posibles efectos de los contenidos de agua y solvente en el medio, se encuentra fuera de discusión la acción aceleradora de la acil migración que poseen ciertos soportes sobre los cuales se realiza la inmovilización de las enzimas, o incluso sales que se adicionan a los mismos (Kodali et al. 1990, Sjursnes et al. 1995, Du et al. 2005). Debido al origen termodinámico del proceso de isomerización, la temperatura posee una gran influencia sobre las velocidades de migración (Yang et al. 2005). Por último, se sabe que la velocidad de isomerización y la relación de equilibrio 1(3),2-DAG:1,3-DAG dependen del tamaño y naturaleza de los ácidos grasos involucrados en el proceso (Serdarevich 1967, Boswinkel et al. 1996, Laszlo et al. 2008).

El presente trabajo se comenzó con un estudio del perfil acídico en la posición *sn*-2 tanto de los sustratos como de los productos de la interesterificación enzimática de aceite de soja (SO) y el mismo completamente hidrogenado (FHSO). Se realizaron predicciones a partir de consideraciones teóricas, para luego comparar las mismas con los datos experimentales obtenidos con diferentes relaciones de sustratos y tipos de enzima.

Luego, se llevó a cabo un estudio de la ocurrencia del fenómeno de acil migración en la reacción de interesterificación en estudio considerando al porcentaje molar de 1,3-DAG respecto al total de DAG como indicador del grado de acil migración alcanzado en los diferentes productos. Se evaluó en particular el efecto

del tipo y concentración de enzima, grado de insaturación de los residuos acilo de las mezclas reactivas, presencia de hexano en el medio de reacción e influencia de la temperatura en estos últimos sistemas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El SO (composición aproximada de ácidos grasos predominantes como FAMEs: 53.0% C18:2, 20.0% C18:1, 11.0% C16:0, 6.0% C18:3, de acuerdo al Método Oficial AOCS Ce 2-62 y Ce 1e-91 (2006)) fue provisto por Molinos Río de la Plata S.A. (Buenos Aires, Argentina) y el FHSO (composición aproximada de ácidos grasos predominantes como FAMEs: 83.8% C18:0, 12.3% C16:0, 1.4% C18:1) fue amablemente provisto por Calsa S.A. (Buenos Aires, Argentina). La enzima inmovilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM, inmovilizada en una resina de intercambio iónico) y *Thermomyces Lanuginosa* (Lypozyme TL IM, inmovilizada en sílica gel granulada) fueron un generoso obsequio de Novozymes Latin America Ltd. (Brazil). La lipasa pancreática (20.3 U/mg) y el N-Metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) fueron obtenidos de Fluka (Buchs, Switzerland). Todos los estándares (1,3-dipalmitina, tricaprina), con pureza superior a 98%, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). La piridina utilizada fue comprada a J.T. Baker (Philipsburg, USA). Los restantes reactivos, gases y solventes fueron de grado analítico o cromatográfico.

Métodos

Protocolo de reacción

Las reacciones se llevaron a cabo en sistemas cerrados provistos de agitación magnética y mantenidos a temperatura constante por medio de un fluido calefactor. La mezcla de grasa y aceite (1 g total) fue precalentada y homogeneizada previo al agregado de la enzima inmovilizada, momento en el que se comenzó a desarrollar la reacción. En los sistemas con solvente, se adicionaron 3 mL de hexano cromatográfico (previamente deshidratado con tamices moleculares, 20 g en 300 mL (Maruyama et al., 2000)) a la mezcla de reacción. La interrupción de la reacción fue realizada mediante el filtrado de la mezcla con papel de filtro Whatman grado 1. Los productos de reacción fueron inmediatamente almacenados a temperaturas inferiores a 0 ºC. En el caso de los sistemas con solvente se procedió a evaporar el mismo bajo corriente de nitrógeno hasta peso constante previo a su almacenamiento. Cabe aclarar que la totalidad de las muestras se obtuvieron de ensayos independientes con el objetivo de evitar la propagación de posibles errores experimentales.

Análisis de subproductos

Los DAG fueron preparados y analizados por GC de acuerdo a Gutiérrez-Ayesta et al. (2007) con modificaciones. Se utilizó un cromatógrafo de la serie 4890D (Agilent, Hewlett-Packard), con una columna capilar (MXT-65TG, 30 m x 0.25 mm x 0.10 μm espesor de película; Restek, Bellefonte, USA). Hidrógeno a 41 cm/s fue utilizado como gas carrier. Durante la inyección se utilizó el modo split con una relación 1:60. La temperatura del horno fue programada de la siguiente manera: 40 ºC durante 4 min, luego incrementada hasta 350 ºC a 25 ºC/min, y finalmente mantenida a esta temperatura por 15 min. Las temperaturas del inyector y FID fueron 360 y 380 ºC, respectivamente. Para cuestiones de cuantificación, el método del estándar interno fue implementado, siendo la dipalmitina el estándar considerado y la tricaprina el estándar interno utilizado. La adquisición de datos e integración de los picos fue llevada a cabo utilizando el software HP 3398A GC Chemstation Software (Hewlett-Packard, 1998).

Composición de ácidos grasos en posición sn-2

Se implementó la técnica de la lipasa pancreática, siguiendo el Método Oficial AOCS Ch 3-91 (2006) con modificaciones . Éste Método recomienda desarrollar la reacción de la lipasa pancreática a 40 ºC. Debido a que ciertos productos de reacción obtenidos poseen puntos de fusión por encima de esta temperatura, la reacción fue desarrollada a 52 ºC (temperatura a la cual una mezcla 50:50 (SO:FHSO, %w/w) es totalmente solubilizada en hexano). Se utilizó un aceite de composición acídica en posición *sn*-2 conocida, de manera de asegurar similares resultados a 52 y 40 ºC.

En el caso del aceite de soja hidrogenado, dado su alto punto de fusión, su perfil acídico en posición *sn*-2 fue calculado teóricamente a partir de las distribuciones determinadas experimentalmente para ciertas mezclas de sustratos.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como medias ± desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por test *t* con un nivel de significación de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio del perfil de TAG y residuos acilo en la posición sn-2

Sustratos

A continuación se presentan las distribuciones de los residuos acilo, clasificados según estos sean saturados o insaturados, en las posiciones *sn*-2 y *sn*-1,3 en las mezclas de reacción utilizadas (Tabla 1).

Tabla 1: Distribución global y posicional de los ácidos grasos correspondientes a las mezclas reactivas iniciales (% mol/mol)

		Relación de sustratos SO:FHSO (m/m)			
		50:50	**60:40**	**65:35**	**70:30**
Global[A]	%S	58.44 ± 0.01	50.53 ± 0.01	46.57 ± 0.02	42.62 ± 0.02
	%U	41.56 ± 0.01	49.47 ± 0.01	53.43 ± 0.02	57.38 ± 0.02
Posición *sn*-2	$\%S_2$	50.30 ± 3.37	41.00 ± 1.77	36.35 ± 2.86	31.70 ± 0.98
	$\%U_2$	49.70 ± 3.06	59.00 ± 1.11	63.65 ± 1.25	68.30 ± 1.12
	$\left(\frac{\%U_2}{\%S_2}\right)$	0.99 ± 0.10	1.44 ± 0.11	1.75 ± 0.24	2.15 ± 0.14
Posición *sn*-1,3	$\%S_{1,3}$	62.51 ± 3.37	55.30 ± 1.77	51.69 ± 2.86	48.08 ± 0.98
	$\%U_{1,3}$	37.49 ± 3.06	44.70 ± 1.11	48.31 ± 1.25	51.92 ± 1.12

SO: aceite de soja refinado.
FHSO: aceite de soja totalmente hidrogenado.
S: ácido graso saturado, U: ácido graso insaturado.
[A]porcentajes calculados teóricamente a partir de la composición de los sustratos.

Predicción de la Relación ($\%U_2/\%S_2$) en Productos Interesterificados

La interesterificación química produce un reacomodamiento totalmente al azar de los residuos acilo en la mezcla de TAG reaccionante, considerando que todos los ácidos grasos presentan la misma reactividad. Por lo tanto, a partir de las composiciones acídicas de los sustratos, y aplicando conceptos básicos de probabilidad (Hustedt, 1976), es posible predecir el patrón de TAG y, en consecuencia, la relación ($\%U_2/\%S_2$) que la mezcla reactante alcanzará en el equilibrio.

Realizando un análisis análogo, es posible obtener la relación ($\%U_2/\%S_2$) considerando un reacomodamiento al azar de los residuos acilo correspondientes a las posiciones *sn*-1 y *sn*-3, manteniendo invariables las posiciones *sn*-2.

En las Tabla 2 se muestran ambas predicciones.

Tabla 2: Relación ($\%U_2/\%S_2$) calculada suponiendo diferentes patrones de aleatorización de los residuos acilo para diferentes mezclas reactivas iniciales

SO:FHSO (m/m)	**($\%U_2/\%S_2$)**	
	Aleatorización total de los residuos acilo	Aleatorización de los residuos acilo en posiciones *sn*-1 y *sn*-3
50:50	0.53	0.99
60:40	0.66	1.44
65:35	0.73	1.75
70:30	0.81	2.15
80:20[A]	1.02	3.47

Para la nomenclatura ver Tabla 1.
[A]Calculada teóricamente a partir de las composiciones de los sustratos.

Perfiles Experimentales de la Relación ($\%U_2/\%S_2$) en Productos Interesterificados
En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para muestras interesterificadas con diferentes relaciones de sustratos iniciales y catalizadas por ambas enzimas, en el equilibrio (después de 48 horas de reacción).

Tabla 3: Relación ($\%U_2/\%S_2$) en el equilibrio para muestras interesterificadas (% mol/mol)

SO:FHSO (m/m)	**Tipo de Enzima**	**($\%U_2/\%S_2$)**
50:50	RM IM	0.69 ± 0.05
	TL IM	0.58 ± 0.03
60:40	RM IM	1.14 ± 0.11
65:35	TL IM	0.96 ± 0.05
70:30	RM IM	1.13 ± 0.07

Para la nomenclatura ver Tabla 1.
Condiciones de reacción: 70ºC, 230 rpm, 5% ($m/m_{sustratos}$) de enzima.

Se puede observar que los valores para los productos obtenidos se encuentran entre los mínimos y máximos posibles, presentados en la Tabla 2. Zhang et al. (2001) encontraron un comportamiento similar al interesterificar química y enzimáticamente una mezcla 75:25 (% m/m) de estearina de palma y aceite de coco con Lipozyme TL IM. Las relaciones ($\%U_2/\%S_2$) que obtuvieron fueron de 1.02, 0.33 y 0.69 para las mezclas iniciales y los productos de interesterificación química y enzimática, respectivamente.
La modificación del cociente ($\%U_2/\%S_2$) puede ser justificada únicamente por la ocurrencia de la reacción de acil migración que indudablemente debe tener lugar en los sistemas de reacción estudiados.

Estudio de Acil Migración

Sustratos

En la Tabla 4 se presentan las composiciones en DAG del SO y del FHSO, así como también las correspondientes a las mezclas a partir de las cuales se realizaron las reacciones para llevar a cabo el estudio presentado en la presente sección.

Tabla 4: Composición en DAG de ambos sustratos y mezclas iniciales de reacción (SO:FHSO)

	SO	FHSO	Mezcla 50:50 (m/m)	Mezcla 80:20 (m/m)
1(3),2-DAG (mM)	0.44 ± 0.12	0.30 ± 0.03	0.37 ± 0.07	0.41 ± 0.10
1,3-DAG (mM)	0.67 ± 0.07	1.00 ± 0.09	0.83 ± 0.08	0.73 ± 0.08
% 1,3-DAG (mol/mol)	60.18 ± 3.59	76.63 ± 2.83	68.40 ± 3.21	63.45 ± 3.44

Para la nomenclatura ver Tabla 1.

Productos de Interesterificación

Efecto del tipo y concentración de enzima

En la Figura 1 se grafica la evolución de la proporción molar de 1,3-DAG respecto al total de DAG durante la interesterificación de mezclas con una relación másica SO:FHSO de 50:50 utilizando ambas enzimas en concentración de 5% (m/$m_{sust.}$).

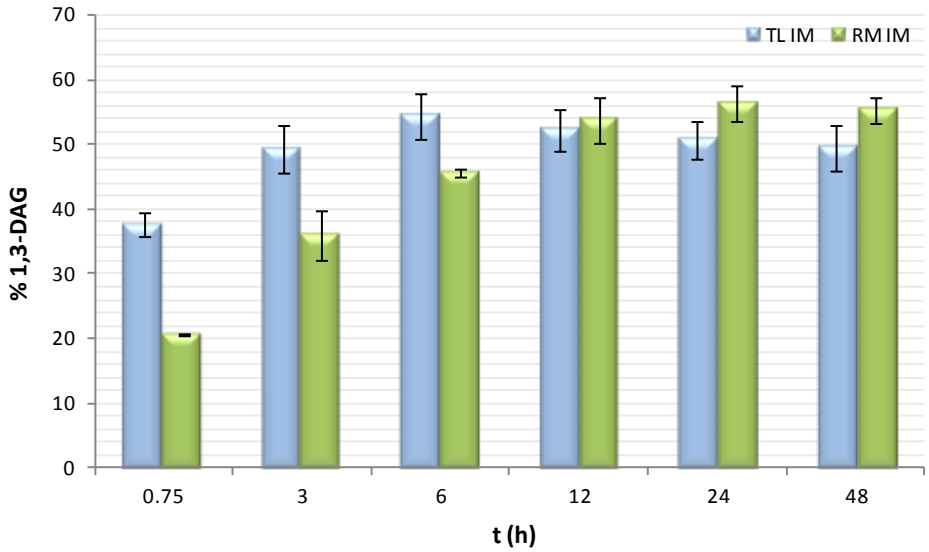


Figura 1: Evolución en el tiempo del porcentaje (mol/mol) de 1,3-DAG respecto al total de DAG (SO:FHSO: 50:50 (m/m), 5% (m/$m_{sust.}$) de enzima y 70ºC).

Analizando los valores obtenidos para las muestras interesterificadas con Lipozyme TL IM, se observa que, alcanzadas las 3 h de reacción, el porcentaje de 1,3-DAG ya se encuentra estabilizado en su valor final, indicando que la reacción de isomerización de los grupos acilo alcanzó su condición de equilibrio. Esto no significa que la reacción global enzimática + química haya alcanzado el equilibrio, ya que las composiciones de 1,3-DAG y DAG totales continúan modificándose con el transcurso del tiempo (datos no mostrados), pero lo hacen manteniendo la relación entre ellas. En cuanto al valor alcanzado, el porcentaje de equilibrio promedio fue de 51.2%. En el caso de Lipozyme RM IM, recién a las 12 h de reacción se observa un nivel de 1,3-DAG estable, del orden de 55.1%. En este caso, el equilibrio de la reacción de isomerización de DAG se alcanza en un tiempo similar al equilibrio global del sistema (datos no mostrados).

El hecho de que se hayan obtenido velocidades de acil migración (relativas respecto a la velocidad de formación de DAG totales), notablemente mayores con Lipozyme TL IM que con Lipozyme RM IM puede ser explicado en términos de los soportes de inmovilización correspondientes. Esta última se encuentra

inmovilizada sobre una resina de intercambio iónico, mientras que el gel de sílice constituye el material de soporte para la primera. Si bien las resinas han sido reportadas como potenciales catalizadoras de la acil migración (Xu et al. 1998), existe aún mayor consenso respecto al alto poder acelerador de este fenómeno por parte del gel de sílice (Kodali et al. 1990, Goh et al. 1993, Du et al. 2005).
Para una concentración de 10% de enzima (m/$m_{sust.}$) en el medio, los resultados se presentan en la Figura 2. Puede observarse que para el caso de Lipozyme TL IM, en una concentración de 10% (m/$m_{sust.}$), ya a los 45 minutos de comenzada la reacción ambos isómeros de DAG se encontrarían en equilibrio. Du et al. (2005) estudiaron el efecto del contenido de agua de dicho catalizador comercial sobre la velocidad de acil migración en DAG encontrando que éste no aceleraba dicha isomerización. Por lo tanto, el resultado obtenido aquí al aumentar la concentración de enzima de 5 a 10% reafirma el concepto de la importancia del efecto catalizador de la acil migración por parte del gel de sílice. En el caso del biocatalizador Lipozyme RM IM utilizado a una concentración de 10%, probablemente entre las 6 y 12 h de reacción se equilibren las concentraciones de los 1,3- y 1(3),2-DAG, alcanzando en dicha relación niveles comparables a los de Lipozyme TL IM. En este caso, si bien la velocidad relativa de migración aumenta respecto a la correspondiente a las muestras con la mitad de enzima, el efecto no resulta tan importante.

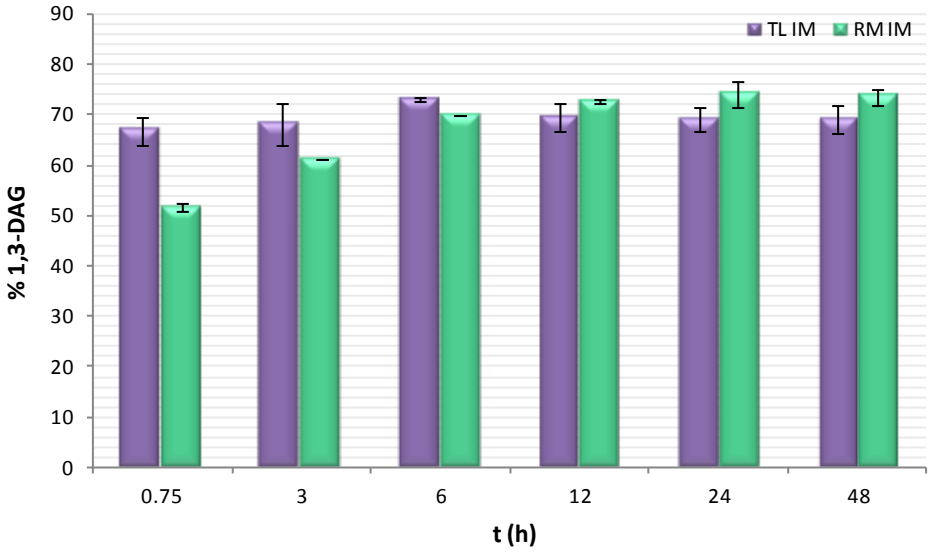


Figura 2: Evolución en el tiempo del porcentaje (mol/mol) de 1,3-DAG respecto al total de DAG (SO:FHSO: 50:50 (m/m), 10% (m/$m_{sust.}$) de enzima y 70ºC).

Efecto de la relación de sustratos
Se analizaron las consecuencias de un cambio en la relación de sustratos de la mezcla de reacción sobre la acil migración en reacciones llevadas a cabo con Lipozyme RM IM y una concentración de enzima de 10%. Se analizaron muestras con relaciones SO:FHSO de 50:50 y 80:20, para las cuales los contenidos de ácidos grasos insaturados se ubicaron en 42.1 y 65.3% (mol/mol). En la Figura 3 se presentan los resultados obtenidos.

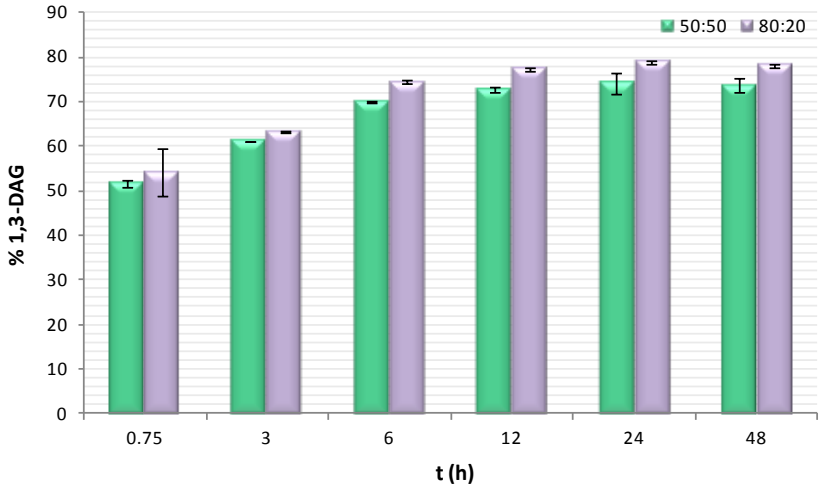


Figura 3: Evolución en el tiempo del porcentaje (mol/mol) de 1,3-DAG respecto al total de DAG (10% de Lipozyme RM IM, SO:FHSO: 50:50 y 80:20 (m/m), 70ºC).

Para ambas relaciones de sustrato el equilibrio entre los isómeros de DAG ya se habría alcanzado para las 12 h de reacción, aunque en el caso de la relación 50:50 el porcentaje de 1,3-DAG se estabiliza en valores menores ($P < 0.03$).

Mattson y Volpenhein (1962) estudiaron la isomerización de diferentes tipos de monoglicéridos (2-monooleína, 2-monopalmitina y 2-monoestearina) y demostraron que el grado de insaturación y el largo de cadena del residuo acilo influyen sobre la velocidad de isomerización, así como también sobre la relación de equilibrio, siendo considerablemente mayor el efecto del grado de insaturación que el de la longitud de la cadena carbonada. Los resultados obtenidos aquí con respecto al nivel de insaturación concuerdan con dicha evidencia.

Efecto del agregado de solvente y de la temperatura

Por último, se propuso evaluar el efecto del agregado de hexano al medio de reacción sobre la cinética de la acil migración. Se analizaron los productos de la interesterificación a 55 y 60ºC de mezclas con una relación másica SO:FHSO de 50:50 tratadas con 5% ($m/m_{sust.}$) de Lipozyme RM IM y el agregado de 3 $mL/g_{sust.}$ de hexano. En la Figura 4 se pueden observar los resultados obtenidos.

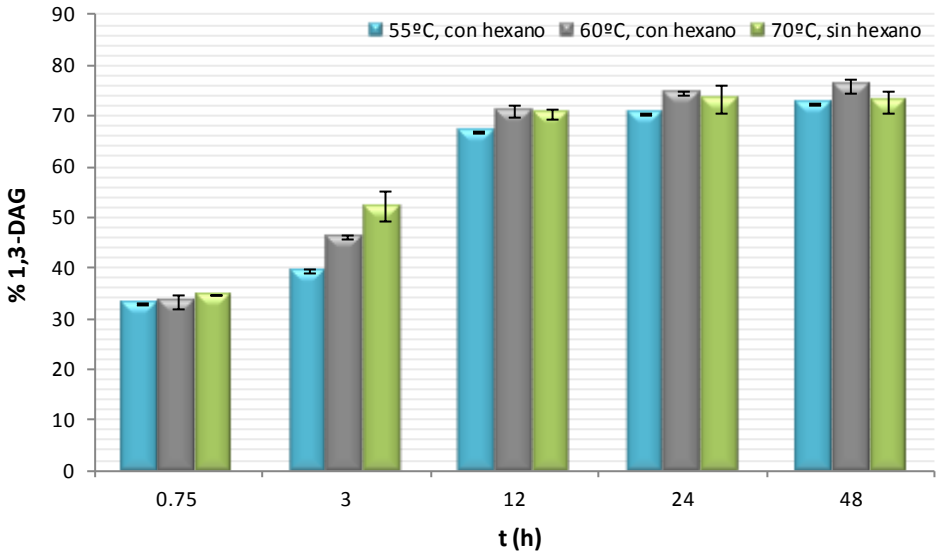


Figura 4: Evolución en el tiempo del porcentaje (mol/mol) de 1,3-DAG respecto al total de DAG (5% ($m/m_{sust.}$) de Lipozyme RM IM, SO:FHSO: 50:50 (m/m), en ausencia y presencia de hexano, a diferentes temperaturas).

Analizando los resultados obtenidos para las muestras interesterificadas en presencia de hexano a 55 y 60ºC es posible apreciar que existiría un aumento en la velocidad relativa de isomerización con la temperatura, así como también se observa una leve disminución en el tiempo al cual se alcanza el equilibrio de isomerización. Como se mencionó anteriormente, la acil migración consiste en un proceso termodinámico, el cual se ve influenciado de manera significativa por la temperatura. Los resultados obtenidos aquí concuerdan con dicha afirmación.

Por otro lado, si se planteara realizar un análisis del efecto del hexano sobre el fenómeno en estudio, la comparación debería realizarse necesariamente sobre muestras interesterificadas a igual temperatura, de manera de anular el comprobado efecto que la misma posee. No fue posible realizar experiencias manteniendo dicha condición de reacción debido a limitaciones propias del sistema. Por un lado, debido al elevado punto de fusión del FHSO utilizado, la mínima temperatura a la cual fue posible realizar las reacciones sin el agregado de solvente fue precisamente 70ºC, el punto de fusión de la misma. De esta forma es posible asegurar que la totalidad de las especies en solución se encuentran en estado líquido, evitando potenciales problemas de limitaciones difusionales en el sistema. Por otro lado, la mayor temperatura utilizada en los sistemas con hexano fue de 60ºC, tomándose un margen considerado aceptable por debajo del punto de ebullición de dicho solvente (69ºC). Si los porcentajes de 1,3-DAG obtenidos en ausencia de hexano hubieran sido menores que los correspondientes a los sistemas con hexano a ambas temperaturas, se podría haber concluido que la presencia de este solvente disminuye la velocidad de isomerización. Sin embargo, los resultados obtenidos no permitirían evaluar de manera independiente el efecto del mismo.

CONCLUSIONES

Se realizó una comparación entre las predicciones teóricas de los ácidos grasos en la posición *sn*-2 según diferentes teorías de distribución de los residuos acilo y los obtenidos experimentalmente luego del proceso de interesterificación enzimática de SO y FHSO. La relación U/S en la posición *sn*-2 varía considerablemente con el mecanismo de redistribución de los residuos acilo. Los resultados reflejan que la relación U_2/S_2 no se mantiene luego de la reacción enzimática, lo que evidencia la ocurrencia en simultáneo a la misma de una reacción química, la acil migración. También fue posible demostrar que los productos obtenidos en distintas condiciones (relación de sustratos, tipo de biocatalizador, concentración de biocatalizador, y fundamentalmente tiempo de reacción) evidencian distintos cambios en la composición acídica *sn*-2 de sus glicéridos.

A partir de los resultados obtenidos del estudio del mecanismo de acil migración en los diglicéridos generados mediante la interesterificación enzimática se puede concluir que la enzima Lipozyme TL IM posee un efecto acelerador de dicho fenómeno, el cual se cree se correlaciona con el material sobre el que se inmovilizó la lipasa (gel de sílice). Por otro lado, un aumento en la concentración de enzima y una mayor proporción de ácidos grasos insaturados en las mezclas reactivas también promovieron la acil migración. Por el contrario, el agregado de hexano en el medio con la consecuente disminución de la temperatura de reacción, disminuyeron el desarrollo de este fenómeno indeseable. En cuanto a la temperatura, su efecto se evaluó sobre muestras interesterificadas en presencia de hexano, y los resultados permitieron corroborar el importante efecto que posee sobre la cinética de la reacción en cuestión, mostrando una correlación positiva con la velocidad de acil migración.

BIBLIOGRAFÍA

AOCS (2006). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Champaign, EEUU, AOCS Press.

Hunter, J. (2001). *Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides*. Lipids. 36(7):655-668.

Ray, S. y D. Bhattacharyya (1995). *Comparative nutritional study of enzymatically and chemically interesterified palm oil products*. Journal of the American Oil
Chemists' Society. 72(3):327-330.

Ferrari, R.; W. Esteves y K. Mukherjee (1997). *Alteration of steryl ester content and positional distribution of fatty acids in triacylglycerols by chemical and enzymatic interesterification of plant oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 74(2):93-96.

Du, W.; Y. Y. Xu; D. H. Liu y Z. B. Li (2005). *Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 37(1-6):68-71.

Rodriguez, J. A.; L. D. Mendoza; F. Pezzotti; N. Vanthuyne; J. Leclaire; R. Verger; G. Buono; F. Carriere y F. Fotiadu (2008). *Novel chromatographic resolution of chiral diacylglycerols and analysis of the stereoselective hydrolysis of triacylglycerols by lipases*. Analytical Biochemistry. 375(2):196-208.
Wang, Y.; H. Wu y M. H. Zong (2008). *Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer*. Bioresource Technology. 99(15):7232-7237.
Fernandez-Lafuente, R. (2010). *Lipase from Thermomyces lanuginosus: Uses and prospects as an industrial biocatalyst*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 62(3–4):197-212.
Xu, X.; A. Skands; C. Høy; H. Mu; S. Balchen y J. Adler-Nissen (1998). *Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification: Elucidation of Acyl migration by response surface design*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 75(12):1179-1186.
Serdarevich, B. (1967). *Glyceride isomerizations in lipid chemistry*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 44(7):381-393.
Kodali, D. R.; A. Tercyak; D. A. Fahey y D. M. Small (1990). *Acyl migration in 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol*. Chemistry and Physics of Lipids. 52(3–4):163-170.
Freeman, I. P. y I. D. Morton (1966). *Acyl migration in diglycerides*. Journal of the Chemical Society C: Organic. 0:1710-1711.
Laszlo, J.; D. Compton y K. Vermillion (2008). *Acyl migration kinetics of vegetable oil 1,2-diacylglycerols*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 85(4):307-312.
Boswinkel, G.; J. Derksen; K. van't Riet y F. Cuperus (1996). *Kinetics of acyl migration in monoglycerides and dependence on acyl chainlength*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 73(6):707-711.
Oda, M.; M. Kaieda; S. Hama; H. Yamaji; A. Kondo; E. Izumoto y H. Fukuda (2005). *Facilitatory effect of immobilized lipase-producing Rhizopus oryzae cells on acyl migration in biodiesel-fuel production*. Biochemical Engineering Journal. 23(1):45-51.
Kaieda M, Samukawa T, Matsumoto T, Ban K, Kondo A, Shimada Y, Noda H, Nomoto F, Ohtsuka K, Izumoto E, Fukuda H. 1999. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by Rhizopus oryzae lipase in a water-containing system without an organic solvent. Journal of Bioscience and Bioengineering, 88(6):627-631.
Goh, SH, Yeong SK, Wang CW. 1993. Transesterification of cocoa butter by fungal lipases: Effect of solvent on 1,3-specificity. Journal of the American Oil Chemists' Society, 70(6):567-570.
Sjursnes B, Kvittingen L, Anthonsen T. 1995. Regioselective lipase-catalyzed transesterification of tributyrin. Influence of salt hydrates on acyl migration. Journal of the American Oil Chemists' Society, 72(5):533-537.
Yang T, Fruekilde MB, Xu X. 2005. Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. Food Chemistry, 92(1):101-107.
Gutiérrez-Ayesta C, Carelli AA, Ferreira ML. 2007. Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids. Enzyme and Microbial Technology, 41(1-2):35-43.
Mattson F H, Volpenhein RA. 1962. Synthesis and properties of glycerides. Journal of Lipid Research, 3(3):281-296.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), y la Universidad Nacional del Sur (UNS) de Argentina.

Marine microalgae as a source of lipids: a comparison between autotrophic and mixotrophic cultivation

Paludo M.P., Menestrino B.C., Peçanha S.G., Burkert, C. A. V.

Bioprocess Engineering Laboratory. Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande do Sul, Brasil.
michepaludo@gmail.com

Resumen: Las microalgas han sido estudiadas en la investigación biotecnológica debido a su importancia nutricional, económica y ecológica. Los lípidos son componentes importantes de las microalgas pueden variar de 1-70% (de materia seca). El objetivo de este estudio fue evaluar los parámetros de crecimiento y el contenido de lípidos de microalgas marinas *Dunaliella tertiolecta* y *Tetraselmis suecica* en un medio que contiene glicerol como fuente de carbono adicional. La máxima concentración de biomasa y la productividad en el cultivo autótrofa de *D. tertiolecta* fueron 0.25±0.04 g L^{-1} y 0.021±0.002 g $L^{-1}d^{-1}$, mientras que en el cultivo mixotrófico los valores obtenidos fueron de 0.29±0.01 g L^{-1} y 0.028±0.001 g $L^{-1}d^{-1}$. En el cultivo autotrófico de *T. suecica*, la concentración máxima de biomasa y la productividad fueron 0.43±0.02 g L^{-1} y 0.043±0.002 g $L^{-1}d^{-1}$, respectivamente, mientras que en el cultivo mixotrófico se alcanzó 0.41±0.02 g L^{-1} y 0.06±0.001 g $L^{-1}d^{-1}$. Además, se observó un aumento en el contenido de lípidos de las microalgas *D. tertiolecta* y *T. suecica* del cultivo mixótrofo con respecto a aquellas del cultivo autótrofo (desde 22.70% a 34.91% para *D. tertiolecta* y desde 8.84% a 21.12% para *T. suecica*).

Palabras claves: Biomasa, Glicerol, Microalgas, Lipídos.

Abstract: Microalgae have been studied in biotechnological research due to their nutritional, economic and ecological importance. The lipids are important constituents of microalgae contents and they may vary from 1-70% (of dry matter). The aim of this study was to evaluate the growth parameters and lipid content of marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in a medium containing glycerol as an additional carbon source. Maximum biomass concentration and productivity in the autotrophic cultivation of *D. tertiolecta* were 0.25±0.04 g L^{-1} and 0.021±0.002 g $L^{-1}d^{-1}$, while in the mixotrophic cultivation the values obtained were 0.29±0.01 g L^{-1} and 0.028±0.001 g $L^{-1}d^{-1}$. In the autotrophic cultivation of *T. suecica*, maximum biomass concentration and productivity were 0.43±0.02 g L^{-1} and 0.043±0.002 g $L^{-1}d^{-1}$, respectively, while in the mixotrophic cultivation it was reached 0.41±0.02 g L^{-1} and 0.06±0.001 g $L^{-1}d^{-1}$. In addition, an increase in lipid content was observed for both microalgae from the mixotrophic cultivation compared to those from the autotrophic cultivation (from 22.70% to 34.91% for *D. tertiolecta* and from 8.84% to 21.12% for *T. suecica*).

Keywords: Biomass, Glycerol, Microalgae, Lipid.

INTRODUCTION

Microalgae are prokaryotic or eukaryotic photosynthetic microorganisms that can grow rapidly and live in harsh conditions due to their unicellular or simple multicellular structure. Microalgae are present in all existing earth ecosystems, not just aquatic but also terrestrial, representing a big variety of species living in a wide range of environmental conditions. It is estimated that more than 50.000 species exist, but only a limited number, of around 30.000, have been studied and analyzed (Richmond 2004).

Microalgae have been studied in biotechnological research due to their nutritional, economic and ecological importance (Costa *et al*. 2006). In this sense, microalgae cultivations have been developed aiming at the biomass production not only for use in the food elaboration but also for the obtainment of natural compounds with high value in the world market. Among the main extracted substances, or with potential of commercial exploration, can be related carotenoids, phycobilins, polysaccharides, vitamins, sterols and lipids (Derner *et al.* 2006). Another important application of microalgae is the production of different types of renewable biofuels. These include methane produced by anaerobic digestion of the algal biomass; biodiesel derived from microalgal oil; and photobiologically produced biohydrogen (Chisti 2007).

The lipid content of the microalgae can range from 1-70%, reaching up to 90% of the dry weight, when subjected to certain cultivation conditions (Spolaore *et al.* 2006). The fatty acids in microalgae correspond to

higher lipid fraction and in some species the polyunsaturated represent between 25 and 60% of total lipids. Compared to higher plants, microalgae have higher photosynthetic efficiency and can be grown in saline environments (Radmann and Costa 2008). The major polyunsaturated fatty acids (PUFAs) components of microalgal biomass are linoleic acid, linolenic acid, arachidonic, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) (Alonso and Maroto 2000). In addition to PUFA 's, microalgae also synthesize saturated fatty acids, raw material for the production of biofuels, especially biodiesel (Khan *et al*. 2009). Some authors have reported an increase in dry weight and increased production of lipids by the microalga *Phaeodactylum tricornutum* using as carbon sources rye, wheat or potato extract (Fábregas *et al*. 1997), glucose and glycerol (Garcia *et al*. 2000). Garcia *et al*. (2000) added glycerol to the medium during the cultivation of this microalga and had a higher biomass production and a percentage of lipids about three times higher than in the autotrophic culture. Factors such as light intensity, temperature and nutrients present in the culture medium may influence the synthesis of these compounds (Radmann and Costa 2008). Fatty acids from microalgae may be used as food, drugs or transformed into biofuels (Derner *et al*. 2006, Amaro *et al*. 2012).

The cultivation of microalgae can be divided into four types: autotrophic, heterotrophic, mixotrophic and photoheterotrophic cultivation. The difference between each of the cultivation is based on the carbon source used and on the use or non-use of light energy. In autotrophic cultivation there is the exclusive use of light as an energy source for CO_2 fixation and release of O_2. Already mixotrophic cultivation uses both light and organic compounds as a source of energy and carbon (Chen *et al*. 2011). Thus, the mixotrophic cultivation is an alternative for production of biomass and lipids when compared to the autotrophic cultivation. The growth rates and increased biomass concentration apparently are linked to synergistic effect of light and organic substrate (Garcia *et al*. 2005).

Among the various organic substrates used in mixotrophic cultivation of microalgae are glucose (Muliterno *et al*. 2005), molasses (Andrade and Costa 2007) and glycerol (Garcia *et al*. 2000, Chi *et al*. 2007, Liang *et al*. 2010). Glycerol has the potential to be used as a carbon source for the cultivation of microorganisms, since it is a byproduct of the biodiesel industry, resulting in the amount of approximately 0.3 kg for each gallon of biodiesel produced (Thompson and He 2006). However, glycerol obtained presents a low commercial value due to the presence of impurities, such as soaps, methanol, free fatty acids, esters, Ca, Mg, P, S, among other elements (Santibáñez *et al*. 2011, Thompson and He 2006, Liang *et al*. 2010). In this way, the presence of such impurities limits the application of glycerol in several processes, increases the cost of purification and restricts their use in chemical and pharmaceutical industries (Amaral *et al*. 2009).

In view what has been reported it is observed that the microalgae have a high capacity production of lipids, and may be favored by mixotrophic cultivation. The objective of the study was to evaluate the growth parameters and lipid content of marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in medium containing glycerol as an additional source of carbon.

MATERIALS AND METHODS

Strains

The marine microalgae used in the study were *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica*. Microalgae were obtained from LABIOMAR (Universidade Federal da Bahia, Brasil).

Culture conditions

Microalgae were cultivated in photobioreactors type one-liter Erlenmeyer flask containing 900 ml Conway medium (Walne 1966), salinity 28 psu (pratical salinity unit) temperature 24±1°C, illuminance of 3000 *Lx*, constant stirring and integral photoperiod (24:0). The photobioreactors were arranged in an incubator with photoperiod (Eletrolab, Brazil).

The Conway medium (Walne 1966) was prepared with natural sea water previously treated and sterile, with addition of 1 mL of main solution and 0.1 mL of vitamins solution. **Table 1** presents the composition and preparation of the medium.

We evaluated two types of cultivation: autotrophic cultivation (Conway medium without glycerol); and mixotrophic cultivation (Conway medium added glycerol 0.05M). In mixotrophic experiments, glycerol PA was sterilized separately from culture medium in an autoclave at 121°C for 15 min.

The inoculum concentration corresponded to 10% of the culture medium used.

Table 1: Composition and preparation of the medium Conway (Walne, 1966)

Main solution	
Components	**Amount (g L^{-1})**
$C_{10}H_{14}O_8Na_2.2H_2O$	45
H_3BO_3	33.60
$NaNO_3$	100
$MnCl_2.4H_2O$	0.36
$FeCl_3.6H_2O$	1.30
$NaH_2PO_4.2H_2O$	20
Dilute all components in 1 L of distilled water and sterilize at 121° C for 15 min.	
Trace metals solution	
$ZnCl_2$	0.21
$CoCl_2.6H_2O$	0.20
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.09
$CuSO_4.5H_2O$	0.20
Dilute all components in 10 mL of distilled water. Take 1 mL of this solution and add to the main solution, pre-sterilized. Discard the remaining 9 mL.	
Vitamins solution	
Vitamina B12	0.005
Vitamina B1	0.1
In an aseptic chamber, dilute the vitamins in 100 mL of distilled water, pre-sterilized.	

Analytical determinations

Daily aliquots of the autotrophic and mixotrophic cultures were removed and centrifuged at 3640g for 10 min for analytical determinations in the supernatant (pH and glycerol concentration) and biomass (biomass concentration). The cell concentration was estimated by absorbance at 680 nm (spectrophotometer Biospectro SP-220, China), using a standard curve previously determined with dry biomass. The pH was determined using a digital potentiometer (Marte MB-10, Brazil).

In mixotrophic cultivation, consumption of glycerol was accompanied from an enzymatic-colorimetric kit for triacylglycerols (Labtest, Brazil). Samples of the supernatant (0.03 mL) were added to 3 mL of reagent and maintained at 37°C for 10 min. The absorbance was measured at 505 nm using glycerol as the standard (Rosa *et al*. 2010).

All experiments were conducted in triplicate. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test in order to verify significant differences regarding the presence or absence of glycerol in the medium culture, at 95% confidence level ($p \leq 0.05$).

Lipid content

At the end of autotrophic and mixotrophic cultivation, the supernatant was separated from biomass for the determination of total lipids. The analysis was performed on dry biomass, which was centrifuged, washed with distilled water and dried at 50°C to constant weight. The total lipid content was determined by Bligh and Dyer (1959), using the amounts suggested by Manirakiza *et al*. (2001).

The determinations were performed in duplicate and the results were evaluated by Student's t test at 95% confidence level ($p \leq 0.05$) in order to verify the existence of significant differences between the lipid content of the autotrophic and mixotrophic cultivation.

RESULTS AND DISCUSSION

Growth parameters

Figure 1 shows the growth curves of microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* of autotrophic and mixotrophic cultivation.

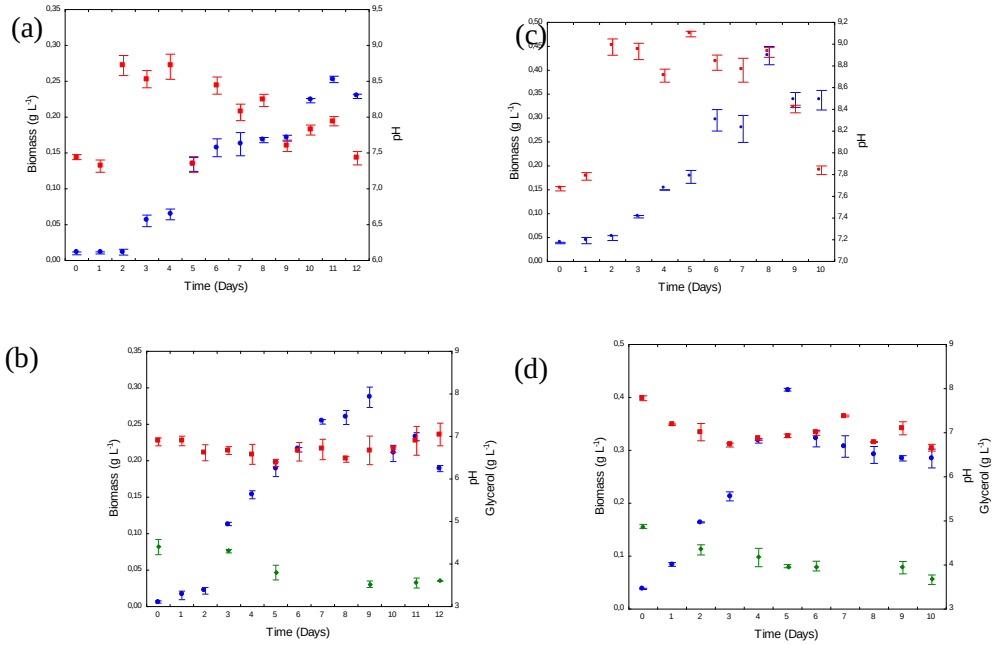


Figure 1: *D. tertiolecta* (**a**) Autotrophic cultivation (**b**) Mixotrophic cultivation; *T. suecica* (**c**) Autotrophic cultivation (**d**) Mixotrophic cultivation (●) Biomass (g L^{-1}); (▪) pH; (♦) Glycerol (g L^{-1})

The growth curves of Figure 1 shows an increase in maximum concentration of biomass of microalgae *D. tertiolecta* in mixotrophic cultivation, reaching 0.29 g L^{-1} at 10th day, while the autotrophic cultivation was 0.25 g L^{-1} on day 12. The growth of microalgae *T. suecica* in autotrophic and mixotrophic cultivation did not present a statistically significant difference, obtaining maximum biomass concentration of 0.43 g L^{-1} on the 9th day and 0.41g L^{-1}, on day 6, respectively.
The consumption of glycerol by *D. tertiolecta* was 18.2% while *T. suecica* corresponded to 24.8%.
Table 2 shows a comparison of autotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae *D. tertiolecta* and *T. suecica* in relation to growth parameters evaluated.

Table 2: Mean values ± standard deviation for maximum biomass concentration, productivity and maximum specific growth rate of microalgae *D. tertiolecta* and *T. suecica* and statistical analysis of the data

Parameters (mean ± standart deviation)	**Autotrophic cultivation**		**Mixotrophic cultivation**	
	Dt	***Ts***	***Dt***	***Ts***
$X_{máx}$ (g L^{-1})	0.25 ± 0.04^{b}	0.43 ± 0.02^{a}	0.29 ± 0.01^{a}	0.41±0.02^{a}
Prod. (g L^{-1} dia^{-1})	0.021 ±0.002^{b}	0.043±0.002^{b}	0.028 ± 0.001^{a}	0.06±0.001^{a}
$\mu_{máx}$ (dia^{-1})	0.50 ± 0.01^{b}	0.30±0.03^{b}	0.56 ± 0.01^{a}	0.38±0.01^{a}

Dt – Dunaliella tertiolecta; Ts – Tetraselmis suecica; X_{max} – Maximum biomass concentration; P – Productivity; μ_{max} – Maximum specific growth rate.
* Equal small letters indicate that there is no meaning difference between lines, at 95% of confidence ($p<0.05$).

Note that the mixotrophic cultivation of *D. tertiolecta* and *T. suecica* also contributed in increasing productivity and maximum specific growth rate. Thus, it was observed that the addition of glycerol to the culture medium contributed positively in the increment of the parameters studied, with emphasis on microalgae *T. suecica*.
According to Garcia *et al.* (2000) increased biomass possibly associated with this synergistic effect of light and organic substrate (glycerol).
Studies reporting the mixotrophic cultivation *D. tertiolecta* and *T. suecica* are not found in the literature.

Lipid content

Table 3 presents the lipid content of microalgae *D. tertiolecta* and *T. suecica* cultivated in autotrophic and mixotrophic conditions.

Table 3: Lipid content of microalgae *D. tertiolecta* e *T. suecica* in autotrophic and mixotrophic cultivation

Microalgae	Lipid content (%)	
	Autotrophic cultivation	Mixotrophic cultivation
D. tertiolecta	22.70[b]	34.91[a]
T. suecica	8.84[b]	21.12[a]

[*]Equal small letters indicate that there is no meaning difference between lines, at 95% of confidence ($p<0.05$).

According to **Table 3**, the mixotrophic cultivation contributed in increasing the lipid content of microalgae *D. tertiolecta* and *T. suecica*, denoting difference statistically significant ($p <0.05$) compared to autotrophic cultivation. Note that the increment of lipids of *T. suecica* was approximately 2 times higher in mixotrophic cultivation.

The increase in the lipid content of microalgae *D. tertiolecta* and *T. suecica* in mixotrophic cultivation may be related to the presence of glycerol in the culture medium. According to Garcia *et al*. (2000), under mixotrophy conditions, some microalgae may increase their growth rate, in addition to producing a higher concentration of fatty acids.

Another important contributing factor in the increase of the lipid content of microalgae is limiting the availability of nitrogen. This is explained by the fact that lack of nitrogen metabolism directs the microalgal before directed to cell multiplication, for the production of reserve components such as saturated fatty acids in order to prepare the cell for a period of deprivation (Alonso and Maroto 2000).

The values obtained are promising when compared to those reported in the literature. In the work of Gouveia and Oliveira (2009) the lipid content obtained for microalgae *D. tertiolecta* was 16.7%, thus demonstrating the results of this study are superior (34.91%).

CONCLUSION

The maximum biomass concentration of microalgae *T. suecica* did not show difference between autotrophic and mixotrófico cultivation. However it was observed that the organic substrate - glycerol - acted positively on productivity and maximum specific growth rate. Mixotrophic cultivation of *D. tertiolecta* promoted the increase in all growth parameters evaluated (maximum biomass concentration, productivity and maximum specific growth rate).

The lipid content of microalgae *D. tertiolecta* and *T. suecica* increased in mixotrophic cultivation, obtaining 34.91% and 21.12%, respectively.

The results showed that the mixotrophic cultivation of microalgae *D. tertiolecta* and *T. suecica* using a glycerol-based medium presented important advantages in relation to the autrotrophic cultivation, in order to obtain microalgae biomass as an alternative source of lipids. In addition, there was the potential use of glycerol as organic substrate in the cultivation of microalgae, showing the possibility of exploring a byproduct of biodiesel as a way to increase the production of lipids.

BIBLIOGRAPHY

Alonso D, Maroto F. 2000. Plant as chemical factories for the production of polyunsatured fatty acids. Biotechnology Advances, 18: 481-497.

Amaral PFF, Ferreira TF, Fontes GC, Coelho MAZ. 2009. Glycerol valorization: New biotechnological routes. Food and Bioproducts Processing, 87:179 – 186.

Amaro HM, Macedo AC, Malcata FX. 2012. Microalgae: An alternative as sustainable source of biofuels? Energy, 44: 158-166.

Andrade MR, Costa JAV. 2007. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. Aquaculture, 264: 130 – 134.

Bligh GE, Dyer JW. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37: 911-917.
Costa JAV, Morais MG, Dalcanton F, Reichert CC, Durante AJ. 2006. Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigeniccyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. Zeitschrift fur Naturforschung, 61: 105-110.
Chen C, Yeh K, Aisyah R, Lee D, Chang J. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. Bioresource Technology, 102: 71-81.
Chi ZY, Pyle D, Wen ZY, Frear C, Chen SL. 2007. A laboratory study of producing docosahexaenoi acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. Process Biochemistry, 42: 1537–1545.
Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. 25: 294–306.
Derner RB, Ohse S, Villela M, Carvalho SM, Fett R. 2006. Microalgas, produtos e aplicações. Ciência Rural, 36: 1959-1967.
Fábregas J, Morales ED, Lamela T, Cabezas B, Otero A. 1997. Mixotrophic productivity of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* cultured with soluble fractions of rye, wheat and potato. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 13: 349–351.
Garcia CMC, Sevilla FJM, Fernandez FGA, Grima EM, Camacho FG. 2000. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. Journal of Applied Phycology, 12: 239-248.
Garcia MCC, Mirôn AS, Sevilla JMF, Grima EM, Camacho FG. 2005. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. Process Biochemistry, 40: 297-305.
Gouveia L, Oliveira AC. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 36: 269 – 274.
Khan RSA, Hussain RMZ, Banerjee SP. 2009. Prospects of biodiesel product ion from microalgae in India. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 13: 2361–2372.
Liang Y, Sarkany N, Cui Y, Blackburn JW. 2010. Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. Bioresource Technology, 101: 6745–6750.
Manirakiza P, Covaci A, Schepens P. 2001. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer and Modified Bligh & Dyer extraction methods. Journal Food Composition Analytical,14: 93-100.
Muliterno A, Mosele PC, Costa JAV, Hemkemeier M, Bertolin TE, Colla LM. 2005. Cultivo mixotrófico da microalga S*pirulina platensis* em batelada alimentada. Ciência e Agrotecnologia, 29: 1132 - 1138.
Radmann EM, Costa JAV. 2008. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO_2, SO_2 e NO. Química Nova, 31: 7-18.
Richmond A. 2004. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd.
Rosa CFC, Michelon M, Burkert JFM, Kalil SJ, Burkert CAV. 2010. Production of a rhamnolipid-type biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* LBM10 grown on glycerol. African Journal Biotechnology, 9: 9012-9017.
Santibáñez C, Varnero MT, Bustamante M. 2011. Residual glycerol from biodiesel manufacturing, waste or potential source of bioenergy: a review. Chilean Journal of Agricultural Research, 71: 469–475.
Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering, 101: 87-96.
Thompson JC, He BB. 2006. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. Applied Engineering Agriculture, 22; 261–265.
Walne, P.R. 1966. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. Fish. Invest. Lond. Ser. pag 53.

ACKNOWLEDGEMENTS
The authors thank the Brazilian funding agency CAPES, CNPq and PDE/FURG.

Crecimiento celular y producción de carotenoides de *Haematococcus pluvialis* en condiciones autotróficas y mixotróficas de cultivo en diferentes pHs

Reis D.F., Machado Jr. F.R.S., Oliveira K.S.D., Trevisol T.C., Remedi R.D., Burkert C.A.V., Burkert J.F.M.

FURG – Universidade Federal de Rio Grande. Escola de Química e Alimentos. Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, Brasil.
daiane.felixreis@gmail.com

Resumen: De los pigmentos existentes en micro algas, los carotenoides han sido los más explorados comercialmente y se destacan por actuar como colorantes y por tener funciones biológicas importantes, como la actividad antioxidante. La micro alga *Haematococcus pluvialis* se destaca por ser una fuente natural de astaxantina, un carotenoide que se caracteriza por presentar tonalidad rojo-anaranjado y ser responsable por actuar como agente nutricional y de coloración en alimentos, en la acuicultura y en la avicultura. El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia del crecimiento celular y de la bioproducción de carotenoides totales en los cultivos de *H. pluvialis* utilizando medio autotrófico BG-11 y medio mixotrófico BBM con acetato de sodio en diferentes pHs (6, 7 y 8). El medio BBM y acetato de sodio presentó concentración celular máxima de 1,29$\pm$0,07 g.L^{-1} en pH inicial de 7 y el medio BG-11, 0,86$\pm$0,24 g.L^{-1} en pH 6, no presentando diferencia significativa entre ellos ($p<0,05$). Analizando la bioproducción de carotenoides, el medio BBM y acetato de sodio se destacó por presentar un valor significativamente mayor (5653,56$\pm$235,27 µg.g^{-1}) en pH 7 comparado con el medio BG-11, que obtuvo 3026,66$\pm$218,43 µg.g^{-1} de carotenoides totales en pH 7.

Palabras clave: micro alga, astaxantina, cultivo.

Abstract: Among the existing pigments in microalgae, the carotenoids have been the most commercially exploited and stand out because they act as colors. In addition they have important biological activities such as the antioxidant activity. The microalgae freshwater *Haematococcus pluvialis* stands out as a natural source of astaxanthin, a carotenoid characterized by orange-red color and acts as nutritional and coloring agent in food for aquaculture and aviculture. The aim of this study was to evaluate the influence of cell growth and bioproduction of total carotenoids in cultures of *H. pluvialis* using autotrophic media BG-11 and mixotrophic media BBM and sodium acetate at initial pH levels of 6, 7 and 8. BBM and sodium acetate culture medium gave the best value of maximum cell concentration (1.29±0,07 g.L $^{-1}$), using initial pH of 7. The BG-11 medium, showed values of 0.86 ±0,24 g.L^{-1} using initial pH of 6, with no significant difference between the media ($p<0.05$). Analyzing the bioproduction of carotenoids, BBM and sodium acetate culture medium gave the best value of total carotenoids (5653.56 ±235.27 µg.g^{-1}) at initial pH of 7 as compared to BG-11 medium, which obtained 3026 66±218.43 µg.g^{-1} of total carotenoids at initial pH of 7.
Keywords: microalgae, astaxanthin, cultivation

INTRODUCIÓN

Los carotenoides son colorantes naturales y están ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo encontrados en casi todos los phyla en los reinos animales y vegetales, responsables por los colores amarillo, naranja y rojo de muchos alimentos, como frutas, vegetales, yema de huevo, salmón y crustáceos (Lorenz y Cysewski 2000). Entre los carotenoides, se destaca la astaxantina, un pigmento rojo-anaranjado que es empleado en la avicultura y en la pisicultura, sobretodo en la industria de producción de raciones para la cría de pescados y crustáceos, que utiliza principalmente astaxantina sintética (Lourenço 2006, Goodwin 1992, Johson y An 1991).

Los colorantes derivados de fuentes naturales poseen propiedades biológicas importantes, entre ellas la actividad antioxidante. La producción de carotenoides utilizando fuentes microbianas es una alternativa para substituir los pigmentos sintéticos, ya que estos contienen diferentes isómeros y estructuras químicas, ocasionando una pérdida pierda en la actividad biológica (Li *et al.* 2011, Rodríguez-Saiz *et al.* 2010).

El uso de micro algas como fuentes de pigmentos fue descubierto como alternativa importante desde los años 60, pero solamente en los años 80, después de inumerables investigaciones, esta posibilidad se mostró viable. De los pigmentos existentes en micro algas, los carotenoides han sido los más explotados comercialmente (Lourenço, 2006).

Haematococcus pluvialis es una micro alga que, en respuestas a las condiciones de estrés, como deficiencia de nutrientes, pH, alta intensidad de luz ó temperatura, modifica su morfología celular, aumentando el tamaño y produciendo quistes rojos. De esta forma, la micro alga puede sobrevivir por largos períodos en condiciones desfavorables (Rodríguez-Meiozo *et al.* 2010).

En las células verdes, la coloración es conferida debido a la presencia de la clorofila, luteína y β-caroteno que predominan en el contenido total de pigmentos. Cuando el enquistamiento es inducido, la actividad fotosintética disminuye y la cantidad de carotenoides aumenta, pudiendo la astaxantina constituir hasta 98% del contenido total de carotenoides, alcanzando hasta 4% de peso seco (Rodríguez-Meiozo *et al.* 2010, Boussiba 2000; Boussiba y Vonshak 1991).

En el año 2010, el valor de mercado de carotenoides utilizados comercialmente fue estimado en cerca de U$S 1,2 billones, con posibilidad de crecimiento para U$S 1,4 billones hasta el año 2018 (BBC Research 2011). Aún así, la a producción comercial de astaxantina es dominada por la forma sintética. Por lo tanto, es de suma importancia la búsqueda de pigmentos originarios de fuentes naturales, como la micro alga *H. pluvialis*, considerada la fuente más rica en astaxantina (Zhang *et al.* 2009).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia sobre el crecimiento celular y de la bioproducción de carotenoides totales en los cultivos de *H. pluvialis* en medios autotrófico y mixotrófico a diferentes pHs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microrganismo

El microrganismo utilizado en este trabajo fue la micro alga *Haematococcus pluvialis*. El inóculo fue cultivado en medio *Bold Basal Medium* (BBM) descrito en la Tabla 1, en fotobioreactores de 1L conteniendo 700 mL de medio a luminancia constante de 1,5 Klx y temperatura de 24±1ºC (adaptado de Domínguez-Bocanegra *et al.* 2004).

Cultivos

En los cultivos fueron utilizados los medio autotrófico BG-11 (*Blue Green 11*) y medio mixotrófico BBM y acetato de sodio (Tabla 1), empleando 20% de inóculo, aireación de 0,30 $L.min^{-1}$ a temperatura de 24±1ºC, con luminancia de 6 Klx 15 días. El pH fue ajustado inicialmente en 6, 7 ú 8.

Tabla 1: Composición de los medios de cultivo

COMPONENTES	BBM ($mg.L^{-1}$)	BBM e acetato de sodio ($mg.L^{-1}$)	BG-11 ($mg.L^{-1}$)
KH_2PO_4	175	175	40
$CaCl_2.2.H_2O$	25	25	36
K_2HPO_4	75	75	-
$MgSO_4.7H_2O$	75	75	75
$NaNO_3$	250	250	1500
NaCl	25	25	-
H_3BO_3	115	115	2,9
$FeSO_4.7H_2O$	4,9	4,9	-
$EDTA.Na_2$	10	10	115
CH_3COONa	-	2000	-
$FeC_6H_5O_7.(NH_4)_2$	-	-	6
$C_6H_8O_7$	-	-	6
Na_2CO_3	-	-	20
$MnCl_2.4H_2O$	-	-	1,8
$ZnSO_4.7H_2O$	-	-	0,22
$NaMoO_4.7H_2O$	-	-	3,9
$CuSO_4.5H_2O$	-	-	0,079
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	-	-	0,049

Fuente: BBM (Domínguez-Bocanegra e*t al.* 2004), BBM y acetato de sodio (Tripathi *et al.* 1999), BG-11 (Rippka *et al.* 1979).

Determinaciones

La determinación del pH fue realizada por la lectura de la muestra en potenciómetro según AOAC (2000) y la concentración celular fue evaluada diariamente por lectura de absorbancia a 560 nm utilizando espectrofotómetro (Oncel *et al.* 2010).

La ruptura celular fue realizada con 0,05 g de células secas (12 h a 30ºC), con 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) pre calentado a 55ºC, la mezcla fue homogeneizada en agitador mecánico, la reacción se dio durante 1h (adaptado de Fonseca *et al.* 2011). Después de la ruptura se adicionaron 6 mL de acetona para facilitar la extracción del carotenoide. La muestra fue centrifugada a 1800 *g* por 10 minutos para la separación de la fase solvente. El procedimiento de ruptura fue repetido por dos ciclos. A la fase solvente se agregaron 10 mL de cloruro de sodio 20% (p/v) y 10 mL de éter de petróleo. Después de la agitación y separación de fases el exceso de agua fue retirado con sulfato de sodio (Na_2SO_4), dando origen a los extractos caroténicos (Michelon *et al.* 2012). La determinación de la concentración de carotenoides totales en los extractos fue realizada en espectrofotómetro a 474 nm (Rodriguez-Amaya 2001) y los valores de la cuantificación, obtenidos por la Ecuación 1 (Davies 1976), expresados en términos de su carotenoide mayoritario astaxantina en éter de petróleo con coeficiente de absorción molar de 2100 (Sedmak *et al.* 1990).

$$Ce = \frac{\mu g}{g} = \frac{A * V * 10^6}{A_{1cm}^{1\%} * 100 * m} \quad (1)$$

Donde: C_e = carotenoides totales específicos (µg.g^{-1}), A =absorbancia V = volumen (mL); m = biomasa seca (g), $A_{1cm}^{1\%}$ = coeficiente de absorción molar.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, siendo los resultados correspondientes a la media de los valores obtenidos de cada muestra, para la realización de análisis de variancia (ANOVA) y test de *Tukey* ($p<0,05$), para indicación de las condiciones del cultivo más promisoras en cuanto al crecimiento celular y la bioprodución de carotenoides.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cinéticas del crecimiento celular en diferentes pHs iniciales de los medios de cultivos BG-11 y BBM y acetato de sodio fueron realizadas seleccionando las mejores condiciones para el crecimiento celular y la producción de carotenoides, conforme **Figura 1** y **Tabla 2** que mostraron el crecimiento celular máximo.

Tabla 2: Crecimiento celular máximo y velocidad específica máxima del crecimiento en los medios de cultivo BBM y acetato de sodio y BG-11, con 20% de inóculo y pH inicial de 6, 7 y 8.

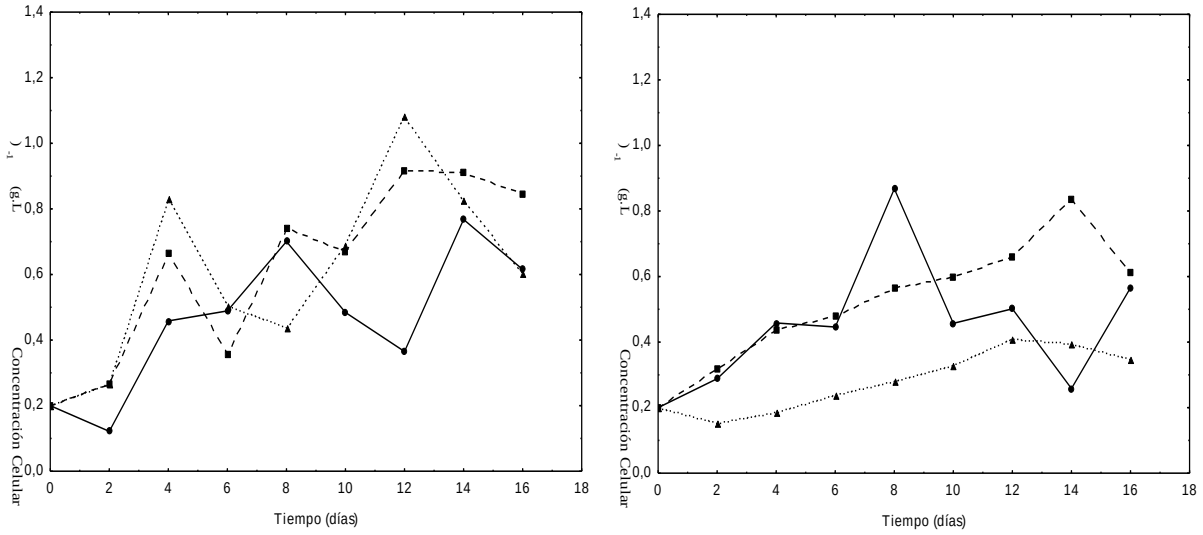
Medio de cultivo	**pH**	**Concentración de inóculo 20%**	
		$X_{máx}$ **(g.L^{-1})**	$\mu_{máx}$ **(dia^{-1})**
BBM y acetato de sodio	**6**	0,92±0,13^{ab}	0,12±0,01^{a}
	7	1,29±0,07^{a}	0,11±0,004^{a}
	8	0,85±0,33^{ab}	0,12±0,001^{a}
BG-11	**6**	0,86±0,24^{ab}	0,09±0,01^{b}
	7	0,83±0,36^{ab}	0,12±0,003^{a}
	8	0,41±0,01^{b}	0,09±0,01^{b}

Média±desvio – respecto al patrón. Letras minúsculas iguales representan que no hay diferencias significativas ($p<0,05$). $X_{máx}$: concentración celular máxima.

La concentración celular máxima alcanzada fue de 1,29±0,07 $g.L^{-1}$ en el medio de cultivo mixotrófico BBM y acetato de sodio en pH inicial de 7, este valor no es diferente estadísticamente de los demás pHs ensayados. Analizando el medio autotrófico BG-11, la concentración celular máxima encontrada fue de 0,86±0,24 $g.L^{-1}$ en pH 6, difiriendo estadísticamente del pH 8 (0,41±0,01 $g.L^{-1}$) con un nivel de confianza de 95%.

Según Thipathi *et al.* (1999), modificaciones en los medios de cultivo de *H. pluvialis* son utilizados para mejorar la productividad de la biomasa y del carotenoide producido. Varios estudios han sido conducidos con el objetivo de aumentar la tasa de crecimiento de la micro alga, los mejores resultados de crecimiento celular se obtuvieron en medios mixotróficos, como el medio BBM adicionado de acetato de sodio ($3,0x10^5$ células.mL^{-1}) y el medio BBM adicionado de L-asparagina ($3,25x10^5$ cél.mL^{-1}) con luminancia de 1,5 Klx a 25ºC, con 7% de inóculo durante 12 días de cultivo.

Resultados inferiores al de este trabajo fueron encontrados por Yoshimura *et al.* (2006), que cultivaron la micro alga en medio *Kobayashi's basal medium*, conteniendo en su composición acetato de sodio, extracto de levadura, L-asparagina y compuestos inorgánicos como $MgCl_2.6H_2O$, $FeSO_4.7H_2O$ e $CaCl_2.2H_2O$, por 14 días, a 20±1ºC, 740 lx, en fotobioreactores de 200 mL, alcanzando el máximo en biomasa de aproximadamente 0,5 $g.L^{-1}$, en 7 días de proceso.



(a) (b)

Figura 1: Cinetica de crecimiento de *H. pluvialis* en medio de cultivo: (a) BBM y acetato de sodio pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8 (▲); (b) BG-11 pH pH 6 (●), pH 7 (■) e pH 8

H. pluvialis utiliza fuentes de carbono orgánicas, como el acetato de sodio. Este compuesto promueve el crecimiento celular más rápidamente comparado con cultivos autotrotróficos, como el medio de cultivo BG-11. Suplementar el medio de cultivo con acetato de sodio puede estimular el crecimiento celular y la formación de los carotenoides. El acetato de sodio puede promover la formación de quistes y mejorar la síntesis de carotenoides. Todavía en grandes cantidades el acetato puede inhibir el crecimiento celular de la micro alga, pudiendo llevar las células a la muerte (Jeon *et al*. 2006, Koyabashi *et al.* 1991).

Oncel *et al.* (2010) relatan que ocurren cambios de coloración desencadenando la formación de carotenoides en medios mixotróficos, y que también promueven el crecimiento celular superior comparado con medios autotróficos.

El pH ejerce influencia en la bioproducción de carotenoides, ya que en pHs alcalinos ocurre la formación de carotenoides y degradación de la clorofila. Células de *H. pluvialis* producen astaxantina en respuesta al estrés, sea por factores ambientales y/ó nutricionales, protegiendo la célula contra los daños oxidativos. En condiciones de estrés como pH elevado, el contenido de clorofila disminuye drásticamente (Sarada *et al.* 2002).

Lababpour *et al.* (2004) analizaron el efecto del pH en los cultivos de *H. pluvialis*. Los experimentos fueron ajustados en pH inicial de 6,8 y después de 150 h el pH alcanzó valores mayores de 10, sin embargo la tasa de crecimiento fue parecida cuando el pH fue mantenido en 6,8 durante todo el proceso, con base en esos resultados los autores optaron por no controlar el pH durante los cultivos.

La **Tabla 3** presenta los resultados de los carotenoides totales específicos después de 15 días en los medios de cultivo BBM y acetato de sodio y BG-11. Las mayores producciones carotenogenicas fueron observadas en el medio BBM y acetato de sodio en pH 7 y 8, de 5653,56±235,27 [y] 4638,72±215,09 $\mu g.g^{-1}$, respectivamente, no presentando diferencia estadística entre sí. Con relación al medio de cultivo BG-11 a pH 6 y 8 presentaron las mayores producciones carotenogenicas, de 3156,92±515,32 y 3262,27±657,79 $\mu g.g^{-1}$, respectivamente.

Del Rio *et al.* (2005) encontraron valores parecidos a los de este trabajo, de 5600 $\mu g.g^{-1}$ de astaxantina. En el estudio, los autores realizaron el cultivo de la micro alga *H. pluvialis* utilizando fotobioreactores de columna, a 25ºC, pH inicial de 7 en cultivos autotróficos con inyección de CO_2 con iluminancia de 1220 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$.

El pH del medio de cultivo puede afectar el crecimiento celular, asi como la producción de carotenoides. *Sarada et al.* (2002) estudiaron la influencia del pH en el crecimiento celular y en la producción de astaxantina de *H. pluvialis*. Los autores utilizaron un medio autotrófico y ajustaron el pH a 5, 6, 7, 8 o 9 con una concentración de inóculo de 10% durante 10 días de cultivo, a 25ºC con luminancia de 1,5 Klx. El conteo máximo de células fue observado a pH 7 ($4,9x10^5$ células.mL^{-1}), no habiendo crecimiento celular a pH 5 ni a pH 9. Las cantidades de pigmentos fueron mayores a pH 7 (8,3 mg.L^{-1}) y pH 8 (10,7 mg.L^{-1}), y significativamente menores a pH 6 (4,9 mg.L^{-1}).

Ghiggi (2007) también investigó la influencia de diferentes pHs iniciales. Al estudiar la optimización de la producción de biomasa y pigmento, observó que el pH inicial de 6-7 presentó los mejores resultados de crecimiento.

Tabla 3: Carotenoides totales específicos ($\mu g.g^{-1}$) en los medios de cultivo BBM y acetato y BG-11 pH iniciales de 6, 7 e 8

Medio de cultivo	pH	Carotenoides Totales ($\mu g.g^{-1}$)
BBM y acetato de sodio	**6**	1612,27±75,37[c]
	7	5653,56±235,27[a]
	8	4638,72±215,09[ab]
BG-11	**6**	3156,92±515,32[bc]
	7	1981,61±777,91[c]
	8	3262,27±657,79[bc]

Média±desvio-patrón. Letras minúsculas iguales representan que no hay diferencias significativas en la columna

La utilización de diferentes medios de cultivo ejerció influencia en la bioproducción de carotenoides. En el medio mixotrófico BBM y acetato de sodio presentó los mejores resultados comparado al medio autotrófico BG-11. *Haematococcus pluvialis* utiliza fuentes de carbono orgánicas, como el acetato de sodio. Este compuesto promovió el crecimiento celular mas rápidamente comparado a cultivos autotrotróficos, como los medios de cultivos BG-11 (Ghiggi, 2007).

El medio BG-11 es utilizado en la manutención de muchas micro algas, inclusive las de agua dulce, pero para algunas cepas este medio puede no presentar los requisitos iónicos necesarios para el crecimiento celular (Rippka, 1979).

El incremento del pH inicial para cada medio estudiado no proporcionó influencia estadísticamente significativa en el crecimiento celular.

CONCLUSIONES

El rango de pH inicial 6-7 presento los mejores resultados de crecimiento celular. *Haematococcus pluvialis* utiliza fuentes de carbono orgánicas, como el acetato de sodio. Este compuesto promueve el crecimiento celular más rápidamente comparado a cultivos autotrotróficos, como los medios de cultivos BG-11. El medio

de cultivo BBM y acetato de sodio obtuvo el mejor valor de concentración celular máxima, de 1,29±0,07 $g.L^{-1}$ y de carotenoides totales, de 5653,56±235,27 $\mu g.g^{-1}$, empleando pH inicial de 7.

BIBLIOGRAFÍA

Association of Official Analytical Chemists - AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of International. 16th Ed. Arlington, Virginia, USA.

BCC Research. Markert Forecasting. The global market for carotenoids (FOD025C). Acesso em maio de 2012. Disponível em: http://www.bccresearch.com

Boussiba, S, Vonshak, A. 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. Plant and Cell Physiology, 32:1077-1082.

Boussiba, S. 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. Physiologia plantarum, 108: 111–117.

Davies, BH. 1976. Carotenoids. In: T.W. Goodwin (Ed). Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Academic Press London, New York, USA, 2:38-165.

Del-rio, E, Acien, FG, Garcia-Malea, M, Rivas, J, Molina-Grima, E, Guerrero, MG. 2005. Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture. Biotechnology and Bioengineering, 91:7.Dominguez-Bocanegra, AR, Leguarreta, GI, Jeronimo MF, Compocosio, AT. 2004. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology, 92: 209–214.

Fonseca, RAS, Rafael, RS, Kalil, SJ, Burkert, CAV, Burkert, JFM. 2011. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. African Journal of Biotechnology, 10:1165-1171.

Ghiggi, V. 2007. Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento astaxantina por *Haematococcus pluvialis.* Dissertação (mestrado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná, UFPR. Curitiba, PR, 119p.

Goodwin, TW. 1992. Distribution of carotenoids. methods in enzymology. Carotenoids, Part A: Chemistry, separation, quantitation and antioxidation, 213: 167-172.

Jeon, YC, Cho, CW, Yun, YS. 2006. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. Enzyme and Microbial Technology, 39: 490-495.

Johnson, EA, An, GH. 1991. Astaxanthin from microbial sources. Crit. Rev. Biotechnology, 11: 297-326.

Kobayashi, M, Kakizono, T, Nagai, S. 1991. Astaxanthin prodution by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. Journal of Fermentation and Bioengineering, 71: 335-339.

Lababpour, A, Hada, K, Shimara, K, Katsuda, T, Katoh, S. 2004. Effects of nutrient supply sethods and illumination with blue light emitting eiodes (LEDs) on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis.* Journal of Bioscience and Bioengineering, 98: 452-456.

Li, J, Zhu, D, Niu, J, Shen, S, Wang, G. 2011. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. Biotechonology Advances, 29: 568-574.

Lorenz, TR, Cysewski, GR. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Elsevier Science Ltd, 18: 160-167.

Lourenço, SO. 2006. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. São Carlos, SP. Ed.Rima, p. 442-446.

Michelon, M, Borba, TM, Rafael, RS, Burkert, CAV, Burkert, JFM. 2012. Extraction of carotenoid from *Phaffia Rhodozyma*: a comparison between different techniques of cell disruption. Food Science and Biotechnology, 12: 1-8, 2012.

Oncel, SS, Imamoglu, E, Gunerken, E, Sukan, FV. 2010. Comparison of different cultivation modes and light intensities using mono-cultures and co-cultures of *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella zofingiensis*. J Chem Technol Biotechnol, 86: 414-420.

Rippka, R, Deruelles, J, WAterbury, JB, Herdman, M, STanier, R. 1979. Generic assignnments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. Journal of General Microbiology, 111:1-61.

Rodriguez-Amaya, BB. 2001. A Guide to Carotenoid Analysis in Food. ILSI Press. Washington, USA. 64p.

Rodríguez-Meiozo, I, Rodríguez-Meiozo, L, Cifuentes, A, Santoyo, S., Suarez, S, Ibánez-Senorans, FX. 2010. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. Food and Technology, 43: 105-112.

Rodriguez-Saiz, MR, Fuente, J., Barredo, JL. 2010. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. Appl Microbiol Biotechnol, 88: 645–658.

Sarada, R, Tripathi , U, Ravishankar, GA. 2002. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. Process Biochemistry, 37: 623–627.
Sedmak, JJ, Weerasinghe, DK, Jolly, SO. 1990. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma.* Biotechnology Techniques, 4: 107–112.
Tripathi, U, Sarada, R, Ramachandra Rio, S, RAvinshankar, GA. 1999. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. Bioresource Technology, 68: 197-199.
Zhang, BY, Geng, Y H, Li, K Z, Hu, J H, Li, GY. 2009. Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. Aquaculture, 295: 275–281.
Yoshimura, S, Ranjbar, R, Inoue, R, Katsuda, T, Katoh, S. 2006. Effective utilization of transmitted light for astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 102: 97-101.

AGRADECIMIENTOS
CAPES/Rede NANOFOTOBIOTEC y CNPq.

Carotenoides de *Haematococcus pluvialis* y *Phaffia rhodozyma:* estudio de la actividad antioxidante

Reis D.F., Remedi, R.D., Cipolatti E.P., Burkert C.A.V., Burkert J.F.M..

FURG – Universidade Federal de Rio Grande. Escola de Química e Alimentos. Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, Brasil.
daiane.felixreis@gmail.com

Resumen: Además de ser pigmentos, los carotenoides poseen propiedades biológicas importantes, entre ellas en enfermedades donde los radicales libres desempenãn papel fundamental. Si bien muchos micro-organismos productores de carotenoides, algunos son biotecnológicamente interesantes, destacándose la micro alga *Haematococcus pluvialis* y la levadura *Phaffia rhodozyma* por la producción de astaxantina. La astaxantina es un pigmento rojo-anaranjado y un antioxidante extremamente potente, utilizado en la piscicultura y en la avicultura. El objetivo de este estudio fue investigar la actividad antioxidante de los carotenoides producidos por la micro alga *H. pluvialis* y por la levadura *P. rhodozyma.* En la determinación de la actividad antioxidante de los extractos carotenicos fueron utilizados tres métodos: $ABTS^{+}$, DPPH y el poder de reducción del hierro (FRAP). Los extractos carotenicos de la micro alga no presentaron actividad antioxidante para los métodos DPPH e FRAP, por otro lada para la levadura, la actividad antioxidante utilizando estos métodos fueron de 34,8±2,3 % inibición.μg^{-1} y 0,5 de absorbancia, respectivamente. Ambos micro-organismos fueron capaces de interactuar con el radical ABTS alcanzando un 34,36±0,83 % inhibición.μg^{-1} para *H. pluvialis y* un 37,8±2,0 % inhibición.μg^{-1} para *P. Rhodozyma*. La utilización microbiana para la producción de los carotenoides puede ser una alternativa, generando biocompuestos de alto valor biológico, como la actividad antioxidante.

Palabras clave: micro-organismos, carotenoides, capacidad antioxidante.

Abstract: In addition to coloring, the carotenoid has important biological properties, as in diseases where the free radicals play a fundamental role. While there are many micro-organisms producers of carotenoids, some are biotechnologically interesting, especially to the production of astaxanthin, as the by microalgae *Haematococcus pluvialis* and the yeast *Phaffia rhodozyma*. Astaxanthin is an orange-red pigment and an extremely potent antioxidant, used for aquaculture and poultry. The aim of this study was to investigate the antioxidant activity of carotenoids produced by microalgae *H. pluvialis* and the yeast *P. rhodozyma*. In the determination of antioxidant activity of the carotenic extracts were measured by three methods: $ABTS^{+}$, DPPH and the power of reduction of iron (FRAP). The microalgae carotenic extract showed no antioxidant activity for the methods DPPH and FRAP. However for the yeast, the antioxidant activity using these methods were 34.8±2.3 % inhibition. μg^{-1} and 0.5 absorbance, respectively. The two micro-organisms were able to interact with the radical ABTS reaching 34.36±0.83 f% inhibition. μg^{-1} or *H. pluvialis* and 37.8±2.0 % inhibition. μg^{-1} for *P. rhodozyma*. The use of microbial production of carotenoids may be an alternative, generating biocompounds of high biological value, such as the antioxidant activity.

Keywords: microrganisms, carotenoids, antioxidant capacity.

INTRODUCCIÓN

Carotenoides son pigmentos naturales responsables de los colores amarillos, naranja y rojo de muchos alimentos, como frutas, vegetales, yema de huevo, algunos pescados como salmón y trucha; y crustáceos. Más que colorear, los carotenoides poseen actividades biológicas importantes destacándose en la inhibición de enfermedades donde los radicales libres presentan un papel fundamental, como la arteriosclerosis, cataratas, degeneración macular, esclerosis múltiple, cáncer, enfermedades degenerativas y cardiovasculares (Maldonate *et al.* 2007, Bhosale 2004, Lorenz y Cysewski 2000).

En las industrias de alimentos, los carotenoides son utilizados principalmente como colorantes, con el objetivo de reponer el color perdido durante el procesamiento y almacenamiento, colorear los alimentos incoloros y uniformizar la coloración de algunos productos alimenticios. Con el creciente interés por la salud, los carotenoides también han sido adicionados a los alimentos con la finalidad de enriquecer nutricionalmente el producto. Son también precursores de muchos compuestos químicos importantes,

responsables por el aroma de algunos alimentos, fragancias de algunas flores, coloración específica y foto protección (Sanchez-Contreras *et al.* 2000).
Los carotenoides poseen propiedades antioxidantes por reaccionaren con el oxigeno singlete, que constituye una forma altamente reactiva de oxigeno molecular, el cual presenta dos electrones de espin opuesto ocupando orbitales diferentes ó no. Los carotenoides protegen a las células de daños oxidativos provocados por radicales libres y por especies reactivas de oxigeno que pueden ser generados en el citoplasma, en las mitocondrias o en la membrana, atacando a lípidos, proteínas, carbohidratos y DNA (Shami y Moreira 2004).
Los antioxidantes son supresores de los radicales libres responsables por el estrés oxidativo generado por especies reactivas de oxigeno en el cuerpo, así ellos previenen o retardan las especies reactivas de oxigeno que causan enfermedades como cáncer, úlcera, diabetes, enfermedades cardiovasculares entre otras (Kamath *et al.* 2008). Existe una correlación entre la actividad antioxidante de sustratos no polares y la capacidad de inhibir o retardar la aparición de células cancerígenas, retardar el envejecimiento de las células en general. Los antioxidantes también tienen aplicación en la industria, actuando en la protección de cosméticos, fármacos y alimentos, previniendo la descomposición oxidativa de estos por la acción de la luz, temperatura y humedad (Barreiros *et al.* 2006).
Se sabe que la estructura de los carotenoides ejerce influencia sobre la actividad antioxidante. Por ejemplo, la cantaxantina y astaxantina presentaron mejores capacidades antioxidantes que β-caroteno ó zeaxantina. La actividad antioxidante aumenta con el aumento del número de dobles enlaces conjugados, grupos cetona y la presencia de anillos ciclopentano en su estructura (Uenojo *et al*. 2007).
Solamente las plantas, micro algas, hongos y algunas bacterias sintetizan carotenoides, luego esos pigmentos son ofrecidos en la dieta de los animales, muchas veces convertidos en otros carotenoides y son incorporados dentro de varios tejidos (Chaudhuri y Dutta 2010, Goswami, 2010, Lorenz y Cysewski 2000).
Existen muchos microorganismos productores de carotenoides, pero algunos son biotecnológicamente interesantes, destacándose la producción de astaxantina por la micro alga *Haematococcus pluvialis* y por la levadura *Phaffia rhodozyma* (Wang *et al.* 2006). La astaxantina es un pigmento rojo-anaranjado y un antioxidante extremamente potente, utilizado en la piscicultura y en la avicultura. Los colorantes derivados de fuentes naturales son bioactivos, y por ese motivo hay un gran interés en el uso de los mismos, ya que los colorantes sintéticos pueden no presentar actividad biológica. Sustancias biológicamente activas pueden ser utilizadas en el suelo como agentes conservantes naturales en la descomposición de alimentos, como también pueden ser adicionados a la alimentación como ingrediente funcional capaces de favorecer la salud (Rodriguez-Saiz *et al.* 2010, Lourenço 2006, Johnson y An 1991).
El objetivo de este estudio fue investigar la actividad antioxidante de los carotenoides producidos por la micro alga *Haematococcus pluvialis* y por la levadura *Phaffia rhodozyma.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Microrganismos

Los microrganismos utilizados en este trabajo fueron la microalga *Haematococcus pluvialis* y la levadura *Phaffia rhodozyma*.

Inóculo

El inóculo de la micro alga *Haematococcus pluvialis* fue cultivado en medio Bold Basal Medium (BBM) descrito en la Tabla 1, en fotobioreactores de 1L conteniendo 700 mL de medio, con luminancia constante de 1,5 Klx a una temperatura de 24±1ºC (adaptado de Domínguez-Bocanegra *et al.* 2004).
El inóculo de la levadura *Phaffia rhodozyma* fue realizado en erlenmeyers de 500 mL conteniendo en 90 mL del medio extracto de malta y levadura (YM) ($g.L^{-1}$): 3 de extracto de levadura, 3 de extracto de malta, 5 de peptona, 10 de glucosa y 0,2 KNO_3 (Parajó *et al.* 1998), previamente esterilizado a 121ºC por 15 min, y adicionado con10 mL del cultivo original de la reactivación. Se incubó a 25°C, 150 rpm por 48 h o el tiempo necesario para alcanzar $1x10^8$ células.mL^{-1} (Silva 2010).

Cultivos

Para los cultivos de la micro alga fue utilizado el medio mixotrófico BBM y acetato de sodio (Tabla 1). Los cultivos fueron realizados en fotobioreactores con capacidad de 1L, empleando 20% de inóculo, aireacíon de 0,30 $L.min^{-1}$ a temperatura de 24±1ºC, con luminancia de 6 Klx durante 15 días. El pH fue ajustado inicialmente en 8.
Tabla 1: Composición de los medios de cultivo

Componentes	**BBM ($mg.L^{-1}$)**	**BBM y acetato de sodio ($mg.L^{-1}$)**
KH_2PO_4	175	175
$CaCl_2.2.H_2O$	25	25
K_2HPO_4	75	75
$MgSO_4.7H_2O$	75	75
$NaNO_3$	250	250
NaCl	25	25
H_3BO_3	115	115
$FeSO_4.7H_2O$	4,9	4,9
$EDTA.Na_2$	10	10
CH_3COONa	-	2000

Fuente: BBM (Domínguez-Bocanegra e*t al.* 2004), BBM con acetato de sodio (Tripathi *et al.* 1999).

Los cultivos de la levadura *Phaffia rhodozyma* fueron realizados en erlenmeyers de 500 mL con 153 mL del medio de producción YM a pH inicial de 6, adiconado con10% de inóculo, siendo las condiciones operacionales del proceso 25ºC, 180 rpm por 168 h (Silva 2009).

Determinaciones

La determinación del pH fue realizada por lectura de la muestra en potenciómetro según AOAC (2000) y la concentración celular fue evaluada diariamente por lectura de absorbancia a 560 nm para la micro alga (Oncel *et al.* 2010) y a 620 nm para la levadura (Kusdiyantini, 1998) utilizando espectrofotómetro.

Para la determinación de carotenoides totales se utilizó el volumen restante al final de los cultivos, el cual fue centrifugado y el excedente fue descartado. La ruptura celular fue realizada a partir de 0,05 g de células secas (12 h a 30ºC), con 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) precalentado a 55ºC, la mezcla fue homogeneizada en agitador mecánico, dejando la reacción actuar durante 1h (adaptado de Fonseca *et al.* 2011). Después de la ruptura fueron adicionados 6 mL de acetona para facilitar la extracción del carotenoide. La muestra fue centrifugada a 1800 *g* por 10 minutos para la separación de la fase solvente. El procedimiento de ruptura fue repetido por dos ciclos. En la fase solvente se agregaron 10 mL de cloruro de sodio 20% (p/v) y 10 mL de éter de petróleo. Después de la agitación y separación de las fases el exceso de agua fue retirado con sulfato de sodio (Na_2SO_4), dando origen a los extractos caroténicos (Michelon *et al.* 2012). La determinación de la concentración de carotenoides totales en los extractos fue realizada en espectrofotómetro a 474 nm (Rodriguez-Amaya 2001) y los valores de la cuantificación obtenidos por la Ecuación 1 (Davies 1976), expresados en carotenoide mayoritario astaxantina en éter de petróleo con coeficiente de absortividad molar de 2100 (Sedmak *et al.* 1990).

$$Ce = \frac{\mu g}{g} = \frac{A * V * 10^6}{A_{1cm}^{1\%} * 100 * m} \quad (1)$$

Donde: C_e = carotenoides totales específicos ($\mu g.g^{-1}$), A = absorbancia; V = volumen (mL); m = biomasa seca (g), $A_{1cm}^{1\%}$ = coeficiente de absortividad molar.

En la determinación de la actividad antioxidante de los extractos caroténicos fueron utilizados tres métodos diferentes, siendo ellos la capacidad de interactuar con los radicales $ABTS^+$, DPPH y el poder de reducción del hiero (FRAP).

El método $ABST^+$ (2,2´-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) fue realizado de acuerdo con Rufino *et al.* (2007). Fue preparada una solución básica de 7 mM de ABTS, a partir de esta fue preparado el radical $ABTS^+$, que consiste de la reacción entre 5 mL de la solución basica, con 88 µL de una solución de persulfato de potasio 140 mM. Esta mezcla es mantenida protegida de la luz a temperatura ambiente por 16 h. En ambiente oscuro, fue adicionado en tubos de ensayo el radical $ABTS^+$, juntamente con extractos

carotenicos con concentraciones conocidas de modo de completar 4 mL en cada tubo. La reacción fue monitoreada cada 15min, totalizando 75 min de análisis, las lecturas fueron realizadas a 734 nm (Cipolatti 2012). Fueron calculados los porcentajes de inhibición de la reacción de acuerdo con la Ecuación 2 (adaptado de Sousa *et al.* 2007). Donde la absorbancia control corresponde a los tubos sin la adición de los extractos.

$$\%inhibición = \frac{Abs_{controle} - Abs}{Abs_{controle}} \quad (2)$$

Para la determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH, alícuotas de los extractos carotenicos fueron colocados en contacto con una solución de DPPH en metanol (5.10^{-6} M), y dejados en reposo al abrigo de la luz. La absorbancia fue medida a 515 nm en intervalos de 60, 120 e 180 min (Cipolatti 2012) y la capacidad de secuestrar el radical, expresado como porcentaje de inhibición, calculada con la Ecuación 3 (adaptado de Sousa *et al.* 2007). Donde la absorbancia control corresponde a los tubos sin la adición de los extractos.

$$\%inhibición = \frac{Abs_{controle} - Abs}{Abs_{controle}} \quad (3)$$

El poder de reducción del hiero fue medido con base en el protocolo de Benzie y Strain (1996). El reactivo FRAP es preparado a partir de una solución de 0,1M de tampón acetato (ph 3,6), 10 mm TPTZ, y 20 mM de cloruro de hierro (10:1:1 v/v/v). El reactivo fue calentado a 37ºC, el extracto fue adicionado (Chang *et al.* 2007), y la reacción fue monitoreada a cada 15 min durante 210 min.
Como testigo de la actividad antioxidante fueron utilizados astaxantina y β-caroteno en los métodos arriba descriptos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los carotenoides totales encontrados fueron de 5457,31 $\mu g.L^{-1}$ para *H. pluvialis* y 1804 $\mu g.L^{-1}$ para *P. rhodozyma*.
Los extractos carotenicos obtenidos a partir de la micro alga *H. pluvialis* no demonstraron resultados por los métodos DPPH y FRAP, pese a presentar una mayor concentración de carotenoides totales comparado con la levadura. Eso puede indicar que la capacidad de tomar radicales libres no está directamente relacionada con la concentración de carotenoides totales, y sí con el tipo de carotenoide presente en el extracto caroténico de cada microrganismo. Estos resultados también podrían deberse a que la adición del extracto de la micro alga al radical DPPH produjo una coloración castaña oscura y no violeta como era esperado. Esa modificación en la coloración afectó la lectura espectrofotométrica y puede ser justificada por la alta cantidad de carotenoides presentes en el extracto que induce el efecto inverso a la oxidación (Fu *et al*. 2010).
Para los extractos de la levadura, la actividad antioxidante encontrada para el método DPPH fue de 34,8±2,3 % inhibición.μg^{-1}. La levadura *Phaffia rhodozyma* a pesar de ser indicada como una de las principales productoras de astaxantina es capaz de sintetizar otros carotenoides como luteína y β-caroteno. La posible que la presencia de esos otros carotenoides sea una explicación para los valores encontrados por estos métodos, ya que la actividad antioxidante no esta solamente relacionada con la concentración de carotenoides totales y sí con la estructura de los carotenoides presentes (Passos 2007, Britton 1995).
La **Tabla 2** presenta el potencial de inhibición de los extractos caroténicos de la micro alga *H. pluvialis*, de la levadura *P. rhodozyma* y de los testigos de astaxantina *y* de *β*-caroteno en contacto con radicales ABTS. Es posible visualizar que tanto el extracto proveniente de la levadura como el de la micro alga presentaron valores de inhibición, siendo ellos 37,8% y 34,36% (inhibición.μg^{-1}) respectivamente, superiores a los padrones de β-caroteno y astaxantina.
La mayor parte de las investigaciones relacionadas a la actividad antioxidante, la astaxantina ha sido empleada en fuentes sintéticas puras, apenas algunos estudios utilizaron fuentes microbianas, tal como *H. pluvialis y P. rhodozyma.* La astaxantina sintética está disponible en la forma libre de astaxantina y la astaxantina proveniente de la micro alga ó de la levadura está disponible en mono ó diésteres de astaxantina. Carotenoides libres ó esterificados poseen actividad antioxidantes diferentes (Rodríguez-Meioso *et al.* 2010). Estudios de Yuan *et al.* (2011) indican que la astaxantina producida de forma microbiana está disponible en

forma de diésteres. Esto puede explicar el hecho de que la astaxantina libre analizada en este trabajo presentó un valor significativamente inferior comparada a los extractos caroténicos microbianos, los cuales presentaron resultados superiores comparados con la astaxantina y el β-caroteno.
Debe ser resaltado que los métodos para verificación de la actividad antioxidante utilizados reaccionan de forma diferente frente al radical analizado. Esa diferencia puede ser percibida cuando se observan los extractos caroténicos de la micro alga *H. pluvialis*, que de acuerdo con el método de radical DPPH no fue capaz de interactuar, pero se mostró eficaz en la inhibición del radical ABTS (**Tabla 2**).

Tabla 2 – Actividad antioxidante de los extractos carotenicos de *H. pluvialis* y de *P. rhodozyma* y de los testigos de β-caroteno y astaxantina por el método de ABTS (% inhibición.μg^{-1}) en los tiempos de 15, 30, 45, 60, 75 minutos.

Tiempo (min)	**15**	**30**	**45**	**60**	**75**
β-caroteno	4,3±0,1	4,8±0,2	5,4±0,4	6,0±0,7	6,6±0,9
Astaxantina	17,0±0,0	18,2±0,1	21,1±0,7	22,4±1,1	23,5±1,2
H. pluvialis	24,6±1,7	27,7±1,3	30,5±0,8	32,2±0,8	34,3±0,8
P. rhodozyma	26,8±0,8	32,1±2,0	35,0±1,8	36,3±1,9	37,8±2,0

Media ±desvío respecto al patrón.

La **Figura 1** muestra una elevación en la absorbancia durante el tiempo de reacción, siendo que la levadura alcanzó valores de 0,5 al final de 210 min. Esta elevación no fue observada en los extractos obtenidos a partir de la micro alga. Se debe tener en consideración que las concentraciones de carotenoides presentes en cada muestra no son iguales, lo que puede no reflejar adecuadamente la reducción del hierro. Parrila *et al* (2005) estudiaron la actividad antioxidante de polifenoles de manzana por el método FRAP, y obtuvieron valores de absorbancia de 0,9; 0,6 e 0,5 para quercetina, rutina y ácido clorogénico, este último, mismo valor encontrado para el presente trabajo.

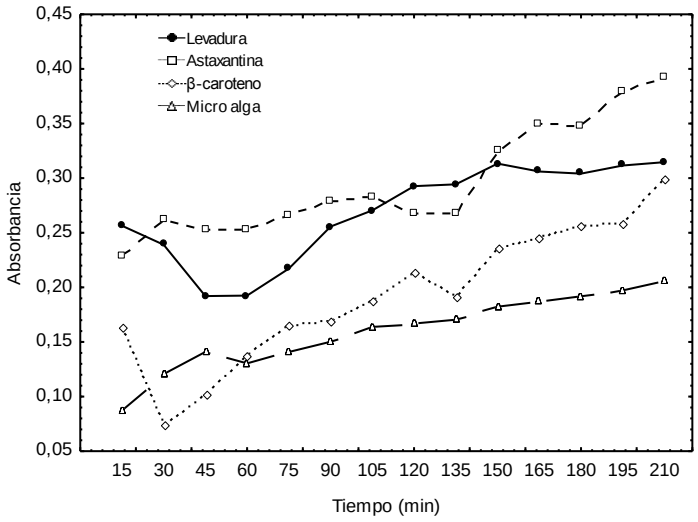


Figura 1: Absorbancia de los extractos caroténicos obtenidos por las biomasas de la levadura *P. rhodozyma,* de la micro alga *H. pluvialis y* de los testigos de astaxantina y β-caroteno a los 210 minutos de análisis por el método FRAP.

CONCLUSIONES

Los carotenoides totales encontrados fueron de 5457,31 $\mu g.L^{-1}$ para *H. pluvialis* y 1804 $\mu g.L^{-1}$ para *P. rhodozyma*. Los extractos caroténicos de la micro alga no presentaron actividad antioxidante para los métodos DPPH e FRAP. Por otro lado, para la levadura la actividad antioxidante utilizando estos métodos

fueron de 34,8±2,3 % inibición.μg^{-1} y 0,5 de absorbancia, respectivamente. Ambos micro-organismos fueron capaces de interactuar con el radical ABTS alcanzando 34,36±0,83 para *H. pluvialis y* de 37,8±2,0 % inhibición.μg^{-1} para *P. rhodozyma*, no presentando diferencia significativa entre los valores encontrados. Por lo tanto, la utilización microbiana para la producción de los carotenoides puede ser una alternativa, generando biocompuestos de alto valor biológico, como la actividad antioxidante.

BIBLIOGRAFÍA

Association of Official Analytical Chemists - AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of International. 16th Ed. Arlington, Virginia, USA.

Barreiros ALB, David JM, David JP. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Química Nova, 29: 113-123.

Benzie IFF, Strain JJ. 1996. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymology, 299: 15-27.

Bhosale P, Gadre RV. 2001. β-Carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant. Journal of Industrial Microbiology, 26: 327–32.

Britton G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. FASEB J., 9: 1551–1558.

Chaudhuri K, Dutta A. 2010. Analysis of tRNA composition and folding in psychrophilic, mesophilic and thermophilic genomes: indications for thermal adaptation. Microbiology Letters, 305: 100-108.

Cipolatti EC. 2012. Obtenção de carotenoides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais do arroz. Rio Grande, RS, Brasil. Dissertação (mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, FURG. 138p.

Davies, BH. 1976. Carotenoids. In: T.W. Goodwin (Ed). Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Academic Press London, New York, USA, 2:38-165.

Dominguez-Bocanegra, AR, Leguarreta, GI, Jeronimo MF, Compocosio, AT. 2004. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology, 92: 209–214.

Fonseca, RAS, Rafael, RS, Kalil, SJ, Burkert, CAV, Burkert, JFM. 2011. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. African Journal of Biotechnology, 10:1165-1171.

Fu H, Xie B, Mab S, Zhu X, Fan G, Pan S. 2011. Evaluation os antioxidante activities of principal carotenoids available in water spinach (*Ipomoea aquática*). Journal of Food Composition and Analysis, 24: 288–297.

Goswami G, Chaudhuri S, Dutta D. 2010. The present perspective of astaxanthin with reference to biosynthesis and pharmacological importance. World J Microbiol Biotechnol, 26: 1925–1939.

Johnson, EA, An, GH. 1991. Astaxanthin from microbial sources. Crit. Rev. Biotechnology, 11: 297-326.

Kamath BS, Srikantia BM, Dharmesh SM, Sarada R, Ravinshankar GA. 2008. Ulcer preventive and antioxidativ properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Europen Journal of Pharmacology, 590: 387-395.

Kobayashi, M, Kakizono, T, Nagai, S. 1991. Astaxanthin prodution by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. Journal of Fermentation and Bioengineering, 71: 335-339.

Kusdiyantini E, Gaudin P, Goma G, Blanc PJ. 1998. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. Biotechomology Letters, 20:10.

Lorenz, TR, Cysewski, GR. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Elsevier Science Ltd, 18: 160-167.

Lourenço, SO. 2006. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. São Carlos, SP. Ed.Rima, p. 442-446.

Maldonade IR, Scamparini ARP, Rodriguez- Amaya DB. 2007. Selection and characterization of carotenoid producing yeasts from Campinas region, Brazil. Brazilian J. Microbiol, 38: 65-70.

Michelon, M, Borba, TM, Rafael, RS, Burkert, CAV, Burkert, JFM. 2012. Extraction of carotenoid from *Phaffia Rhodozyma*: a comparison between different techniques of cell disruption. Food Science and Biotechnology, 12: 1-8, 2012.

Oncel, SS, Imamoglu, E, Gunerken, E, Sukan, FV. 2010. Comparison of different cultivation modes and light intensities using mono-cultures and co-cultures of *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella zofingiensis*. J Chem Technol Biotechnol, 86: 414-420.

Parrila EA, Rosa LA, Torres-Rivas F, Rodrigo-Garcia J, González-Aguilar. 2005. Complexation of Apple Antioxidants: Chlorogenic Acid, Quercetin and Rutin by β-Cyclodextrin (β -CD). Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 53: 121–129.

Passos R. 2007. Extração e caracterização química de carotenoides provenientes de biomassas de interesse para a aquicultura. Florianópolis, SC. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC/PGCAL. 177p.

Rodríguez-Meiozo, I, Rodríguez-Meiozo, L, Cifuentes, A, Santoyo, S., Suarez, S, Ibánez-Senorans, FX. 2010. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. Food and Technology, 43: 105-112.

Rodriguez-Saiz, MR, Fuente, J., Barredo, JL. 2010. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. Appl Microbiol Biotechnol, 88: 645–658.

Rufino MS, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaios CG, Jiménez JP, Calixtro FDS. 2007. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre $ABTS^{+}$. Comunicado Técnico 128. Embrapa. Fortaleza, Brasil.

Sanchez-Contreras A, Jimézez M, Sanchez S. 2000. Appl. Microbiol. Biotechnol, 54:528 -532.

Sedmak, JJ, Weerasinghe, DK, Jolly, SO. 1990. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma.* Biotechnology Techniques, 4: 107–112.

Shami NJIE, Moreira EAM. 2004. Licopeno como agente antioxidante. Revista Nutrição, Campinas, 17: 227-236.

Silva CM. 2010. Produção de carotenoides pela levedura *Phaffia rhodozyma* cepa NRRL-Y 17268: valoração da glicerina (derivada da síntese do biodiesel) e da água de parboilização do arroz. Rio Grande, RS. Dissertação (mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, FURG. 105p.

Silva DA. 2009. Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrohous*) utilizando água de parboilização do arroz. Rio Grande, RS. Dissertação (mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, FURG. 92p.

Tripathi, U, Sarada, R, Ramachandra Rio, S, RAvinshankar, GA. 1999. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. Bioresource Technology, 68: 197-199.

Uenojo M, Junior MRM, Pastore GM. 2007. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. Quim. Nova, nº 3, 30: 616-622.

Wang W, Yu L, Zhou P. 2006. Effects of different fungal elicitors on growth, total carotenoids and astaxanthin formation by *Xanthophyllomyces dendrorhous.* **Bioresource Technology**, 97: 26-31.

Yuan JP, Peng J, Yin K, Wang JH. 2011. Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. Mol. Nut. Food Res., 55: 150-165.

AGRADECIMIENTOS

CAPES, FAPERGS y CNPq.

Evaluation of yeast potential in the obtention of citric acid from raw glicerol

Ribeiro VA, Bertuol, GG, Porto C , Burkert C.A.V

Federal University of Rio Grande (FURG), Bioprocess Engineering Laboratory. Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.
anessa.amaralribeiro@gmail.com

Resumen: En este trabajo, fueron estudiadas seis diferentes cepas de levadura: *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423, *Y. lipolytica* Y-1094, *Y. lipolytica* Y-11853, *Candida lipolytica* Y-1095, *C. oleophila* Y-2317 y *C. cylindracea* Y-17506, utilizando glicerina como fuente principal de carbono en los cultivos microbianos. Estos cultivos fueron realizados por triplicado en frascos bajo agitación, en incubadora rotatoria a 30 ºC y 180 rpm, utilizando medio de cultivo con la siguiente composición (g L^{-1}): 40 glicerina, 1,7 KH_2PO_4, 12 Na_2HPO_4, 1,25 $MgSO_4.7H_2O$, 0,25 extracto de levadura, 0,006 tiamina, 0,25 $(NH_4)_2SO_4$, pH = 6,0. Todas las cepas estudiadas presentaron comportamiento similar, iniciando la fase estacionaria a las 72 h de cultivo. *Y. lipolytica* YB-423, Y-1094, Y-11853 y *C. lipolytica* Y-1095 presentaron un aumento de biomasa que coincidió con la disminución del pH en cultivos, probablemente ocasionado por la producción de ácido orgánico. La *Y. lipolytica* Y-1094 se mostró la mas promisoria para producción de ácido cítrico, alcanzando valores de 5,16 ± 0,21 g L^{-1}, 3,02 ± 0,01 g L^{-1}, 5,03 ± 0,19 g L^{-1} y 0,59 ± 0,03 g L^{-1} en 216 h de cultivo para la biomasa, pH, concentración de ácidos cítrico e isocítrico, respectivamente.

Palabras claves: levadura, ácido cítrico, glicerina

Abstract: In the present work six different yeast strains were tested: *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423, *Y. lipolytica* Y-1094, *Y. lipolytica* Y-11853, *Candida lipolytica* Y-1095, *Candida oleophila* Y-2317 and *Candida cylindracea* Y-17506, using of raw glycerol as main carbon source in microbial cultures. The cultures were performed in triplicate in shaken flasks, conducted in a rotary incubator at 30ºC and 180 rpm, using the culture medium with the following composition (g L^{-1}): 40 glycerol, 1.7 KH_2PO_4, 12 Na_2HPO_4, 1.25 $MgSO_4.7H_2O$, 0.25 yeast extract, 0.006 thiamine, 0.25 $(NH_4)_2SO_4$, pH adjusted to 6.0. All yeast showed similar behavior, starting the stationary phase at 72 h of culture. *Y. lipolytica* YB-423, Y-1094, Y-11853 and *C. lipolytica* Y-1095 showed increased biomass coinciding with the decrease in pH during the culturing, probably caused by the production of organic acid. *Y. lipolytica* Y-1094 was shown to be the most promising for the production of citric acid, reaching values of 5.16 ± 0.21 g L^{-1}, 3.02 ± 0.01 g L^{-1}, 5.03 ± 0.19 g L^{-1} and 0.59 ± 0.03 g L^{-1} after 216 h of culture for biomass, pH, citric and isocitric acids concentration, respectively.

Key-words: Yeast, Citric acid, Glycerol

INTRODUCTION

The citric acid or hydrogen citrate is the most important organic acid produced by fermentation in quantitative terms, due to, among other properties, its low toxicity, when compared to other acidulant used mainly by food and beverages industries (Soccol et al., 2006; Rywin´ska et al., 2011). In addition, the citric acid is also used as additive in detergents, pharmaceuticals, cosmetics and toiletries (Berovic and Legisa, 2007). This shows that its applicability in the industry is quite diverse, which 70% of the total production is intended for industry of food beverages, 12% to the pharmaceutical industry and 18% the other industries. This organic acid is a versatile and innocuous alimentary additive and it is accepted worldwide as GRAS (generally recognized as safe), approved by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Vandenberghe et al, 1999, Soccol et al.,2003, Soccol et al., 2006). The food and pharmaceutical industries utilize citric acid extensively because of its general recognition of safety, pleasant acid taste, high water solubility and chelating and buffering properties (Soccol et al., 2006).

Recent studies show that the citric acid has been used as supplement in animal feed (Boling- Ankenbach et al., 2001; Tsiloyiannis et al., 2001). Therefore, there is an interest in the production of citric acid in large scale.

The citric acid can be obtained in three ways: fruit extraction, synthesis and microbial cultivation. However, microbial cultivation, since 1920, is the process more economical and widely used for obtaining the citric acid, representing about 90% of world production (Timeis, 2000).
Industrially, the filamentous fungi, as *Aspergillus niger*, have been most widely used in the production of citric acid, using sucrose as the main carbon source (Pastore et al., 2011; Rywin'ska et al., 2011). However, this process presents, as disadvantage, the impossibility of using other carbon sources that are not carbohydrates. Thus, an alternative to this technology is the use of yeasts in replacement of fungi, due to its ability to utilize a variety of unconventional substrates as carbon source. In addition, it provides greater tolerance to high concentrations of substrate, higher conversion rate, higher productivity and allow greater control of the process for being unicellular nature (Rywin'ska et al., 2011). Moreover, the biggest disadvantage of yeast is the simultaneous production of isocitric acid, a product with low added value.
Studies have shown good results regarding the use of yeasts *Yarrowia* and *Candida* for the production of citric acid (Fan et al., 2010, Rywin'ska et al., 2011). In yeasts, the production of organic acids occurs via the tricarboxylic acid cycle or Krebs cycle where the ***acetyl coenzyme A*** reacts with oxaloacetate by citrate synthase to forming the citric acid (Crolla and kennedy, 2001). The yeast *Yarrowia lipolytica* (anamorph *Candida lipolytica*) can to degrade glycerol, converting it into products of industrial interest, such as citric acid, pyruvic acid and lipids (Papanikolau et al., 2008).
Several authors have reported that the cost of process is one of the biggest problems faced in the production of this acid, where the substrate represents a high percentage. Aiming to reduce costs, the search for alternatives, such as the use of industrial waste as a component of the culture medium in cultivations carried out by micro-organisms has been studied (Silva et al., 2012).
With the accelerated growth of the biodiesel industries, there has been the generation of large amounts of raw glycerol, which is the main byproducts from production of this biofuel, making it an attractive raw material due mainly to its availability throughout the year and low cost (Rywin´ska et al., 2011). This byproduct if generated in excess can cause serious environmental problems such as pollution, due to improperly way of its disposal for the environment. A promising alternative for the use of glycerol is it conversion by means metabolic in the production of compounds of high value (Papanikolaou et al., 2008; Silva, et al., 2009). Some authors have commented that many metabolites may be produced from the glycerol as the organic acids (Rymowicz et al., 2006; Papanikolaou et al., 2008; Rymowicz et al., 2008; Silva et al., 2009). In literature, several studies has been realized using sugars to form citrate by *Yarrowia lipolytica*, however few studies has been published with the use of residual glycerol as carbon source (Rymowicz et al, 2006). Therefore, this present study was to evaluate different yeast strains as potential for obtaining citric acid using raw glycerol as the main carbon source.

MATERIALS AND METHODS

Strains

The strains *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1094, *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423, *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-11853, *Candida lipolytica* NRRL *Y-1095*, *Candida oleophila* NRRL Y-2317 e *Candida cilindracea* NRRL *Y-17506* were studied in this work. All yeasts were available at the Bioprocess Engineering L***aboratory*** (FURG, Brazil) and certified as GRAS (*Generally Recognized as Safe*).

Carbon source

The raw glycerol derived from the chemical synthesis of biodiesel were supplied by BSBIOS Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A**.** The quantity of raw glycerol added to the culture medium regarded its composition and purity (83%), according to the methodology proposed by the Food Chemicals Codex (1981).

Strains maintenance

The yeasts strains were maintained on YM agar slants (*yeast malt agar*), containing (g L^{-1}): 10 glucose, 5 peptone, 3 yeast extract, 3 malt extract, 20 agar. The tubes were inoculated with the yeasts and incubated for 48 h at 30°C and then stored at 4ºC.

Culture conditions

The growth medium for inoculum preparation contained (g L^{-1}): 30 raw glycerol, 7 KH_2PO_4; 2.5 Na_2HPO_4; 1.5 $MgSO_4.7H_2O$; 0.15 $CaCl_2$; 0.15 $FeCl_3.6H_2O$; 0.02 $ZnSO_4.7H_2O$; 0.06 $MnSO_4.H_2O$; 0.5 $(NH_4)_2SO_4$; 0.5

yeast extract, pH adjusted to 6.0, as proposed by Papanikolau et al. (2002), using raw glycerol as the main carbon source. The suspension was incubated at 30°C in a rotary shaker with agitation rate at 180 rpm, monitoring the cell concentration by counting in a Neubauer chamber.
The cultures were performed in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 200 ml growth medium resulting of add culture medium, yeast suspension and sterile distilled water. The culture medium was prepared in concentrated form in order to result the following composition (g/L) proposed by Levinson et al. (2007): 40 raw glycerol, 1.7 KH_2PO_4; 12 Na_2HPO_4; 1.25 $MgSO_4.7H_2O$; 0.25 yeast extract; 0.006 thiamine; 0.25 $(NH_4)_2SO_4$; pH adjusted to 6.0. The cultures was inoculated with yeast suspension previously prepared to achieve $1x10^7$ cells mL^{-1} and maintained in an rotary shaker at 30 °C shaker with agitation rate at 180 rpm, removing aliquots in the time intervals previously established, and samples were centrifuged at 1780 x g for 15 min.

Analysis determinations
The cell concentration was estimated by optical density at 680 nm using a methodology cited by Choi and Park (2003). The biomass obtained was washed, centrifuged again at 1780 x g for 15 min and suspended in appropriate volume to determine the cell concentration by optical density at 680 nm (spectrophotometer Biospectro SP-220, China). The cell concentration was expressed as dry weight (g L^{-1}), obtained from a calibration curve previously determined for each microorganism. The pH was determined using a digital potentiometer (Marte MB-10, Brazil) and the concentrations of citric acid and isocitric acid were determined by enzymatic kits (R-Biopharm, Germany)

Statistical analysis
Experiments were performed in triplicate and the values were informed as means ± standard derivation. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test in order to verify significant differences regarding the different in the concentration of citric and isocitric acid among yeasts tested, at 95% confidence level ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION
The monitoring of cell concentration and pH during cultivation for the six yeasts strains can be viewed in Figure 1a and 1b, respectively.

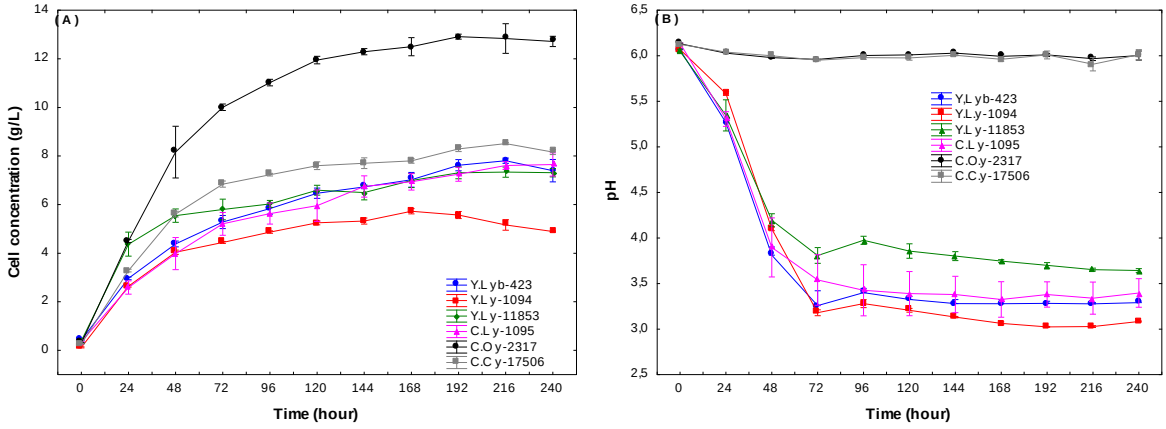


Figure 1: Cell concentration c (A) e pH (B) Medium of cultivation for yeast using glycerin as main carbon source. Abbreviation: Y.L. *yarrowia lipolytica*; C.L. *candida lipolytica*, C.O. *candida oleophila* and C.C. *c*.

Regarding the cell concentration, it was found that maximum biomass produced by yeasts reached values of 5.16 ±0.21 g L^{-1}, 7.80 ±0.11 g L^{-1}, 7.33 ±0.21 g L^{-1}, 7.16 ±0.16 g L^{-1},12.83 ±0.61 g L^{-1} e 8.51±0.41 gL^{-1} for *Y. lipolytica* Y-1094, *Y. lipolytica* YB-423, *Y. lipolytica* Y-11853, *C. lipolytica* Y-1095, *C. oleophila* Y-2317, *C. cylindracea* Y-17506, respectively, at 216 h cultivation. In relation to the pH, more pronounced variation was observed for the yeasts *Y. lipolytica* Y-1094, *Y. lipolytica* YB-423, *Y. lipolytica* Y-11853 and C. *lipolytica* Y-1095, 3.08, 3.27, 3.65 e 3.34, respectively.

According to Figure 1a, it can be seen two distinct phases: the log phase (until 72 h) and the stationary phase (from 72 h to 216 h) for all tested microorganisms. According to Imandi et al. (2007), normally, the production of citric acid by yeasts occurs in two phases. In the first step, microbial growth is favored through a medium with suitable composition, where the growing conditions are optimal; and in the second step occurs the actual production of citric acid, when organic or inorganic nitrogen is limited, reducing the multiplication of cells and accumulating citric acid. Therefore, in order to analyze the citric acid production, the determination of citric acid and isocitric acid were performed at 72 h and 216 h.
The citric and isocitric acid concentrations and citric /isocitric acid ratio at 72 e 216 h of cultivation are shown in the Table 1.

Table 1: Citric acid, isocitric acid and citric acid/isocítrico acid ratio for different yeast strains.

Strain	Cultivation time (hours)	**CA (g L^{-1})	**ICA (g L^{-1})	**CA/ICA Ratio
Y. lipolytica Y-1094	72	3.46 ±0.07^{A}	0.29 ±0.01^{B}	12.02 ±0.58^{C}
Y. lipolytica Y-1094	216	5.03±0.19^{a}	0.59 ±0.03^{a}	8.47 ±0.76^{c}
Y. lipolytica YB-423	72	2.96 ±0.18^{B}	0.08 ±0.01^{C}	39.81 ±4.89^{A}
Y. lipolytica YB-423	216	3.92±0.14^{b}	0.09 ±0.01^{c}	41.96 ±4.71^{b}
Y. lipolytica Y-11853	72	3.36 ±0.32^{AB}	0.45 ±0.03^{A}	7.48 ±0.71^{C}
Y. lipolytica Y-11853	216	3.65 ±0.29^{b}	0.46 ±0.01^{b}	7.90 ±0.32^{c}
C. lipolytica Y-1095	72	1.59 ±0.15^{C}	0.07 ±0.00^{C}	23.50 ±1.73^{B}
C. lipolytica Y-1095	216	4.77 ±0.10^{a}	0.08 ±0.01^{c}	59.49 ±6.23^{a}
C. oleophila Y-2317	72	0.74 ±0.00^{D}	0.06 ±0.00^{C}	12.18 ±0.93^{C}
C. oleophila Y-2317	216	0.88 ±0.01^{c}	0.08 ±0.01^{c}	11.13 ±0.09^{c}
C. cylindracea Y-17506	72	0.73 ±0.00^{D}	0.07 ± 0.00^{C}	10.23 ±0.86^{C}
C. cylindracea Y-17506	216	0.76 ±0.06^{c}	0.08 ±0.01^{c}	9.00 ± 0.77^{c}

**Each value is the mean value ± standard deviation. Capital letters equal inside column indicate there is no significant difference between the concentrations at 72 h. Lowercase letters equal inside column indicate there is no significant difference between the concentrations at 216 h. Abbreviation: CA: citric acid concentration and ICA: Isocitric acid concentration.

The maximum production of citric acid at 216 h cultivation was obtained by *Y. lipolytica* Y-1094 and *C. lipolytica* Y-1095 that differed significantly from the others ($p<0.05$), reaching 5.03 ± 0.19 and 4.77 ± 0.10 g L^{-1} respectively. On the order hand, the concentrations of isocitric acid produced by the six yeasts were less than 0.6 g L^{-1}. The highest citric /isocitric acid was presented by yeast *C. lipolytica* Y-1095.
Silva et al. (2009) achieved a citric acid concentration of 2.5 g L^{-1} using glycerol as carbon source in the cultivation of *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 under nitrogen limiting conditions, while Sa (2011), in the cultivation of *Y. lipolytica* YB 423 in shaken flasks with a medium containing residual glycerol (40 g L^{-1}), reached 11.51% yield (approximately 4.6 g L^{-1} of citric acid) in the absence of thiamine and 7.67% yield (about 3.1 g L^{-1}) in the presence of thiamine.

CONCLUSION

In this work, it was observed that among the microorganisms studied for citric acid production using the residual glycerol as main carbon source, *Y. lipolytica* Y-1094 was selected, reaching 5.03 ± 0.19 g L^{-1} citric acid, 0.59 ± 0.03 g L^{-1} isocitric acid, 5.16 ± 0.21 g L^{-1} biomass and pH 3.08, indicating that the yeast *Y. lipolytica* Y-1094 is more promising for citric acid production, constituting an alternative application of residual glycerol produced by the biodiesel industry.

BIBLIOGRAPHY

AOAC. 2000. *Official Methods of Analysis.* 17th edition. Washington: Association of Official Analytical Chemists.
Berovic M, Legisa M. 2007. Citric acid production. Biotechnology Annual Review, 13: 303- 43.
Boling- Frankenbach SD, Snow JL, Parsons CM, Baker DH. 2001. The effect of citric acid on the calcium and phosphorus requirements of chicks fed corn-soybean meal diets. Poultry Science, 80: 783-788.
Choi MH, Park YH. 2003. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. Biomass & Bioenergy, 25: 221-226.

Fan X, Burton R, Zhou Y. 2010. Glycerol (byproduct of biodiesel production) as a source for fuels and chemicals – mini review. Fuels Energy Sciencie Journal, 3:17–22.
Food Chemical Codex. 1981. 3ª Ed, Edibra National Academy Press. Washington. 1981.
Imandi SB, Bandaru VVR, Somalanka SR, Garapati HR. 2007. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. Enzyme Microbial Technology, 40: 1367–72.
Crolla A and Kennedy, KJ. 2001. Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using n-paraffin. Journal of Biotechnology, 89:27–40.
Levinson WE, Kurtzman, CP, Kuo TM. 2007. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. Enzyme and Microbial Technology, 41: 292-295.
Rymowicz W, Rywińska A, Zarowska B, Juszczyk P. 2006. Citric acid production from raw glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. Chemical Papers, 60: 391- 394.
Rymowicz W, Rywińska A, Gladkowski W. 2008. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. Chemical Papers, 62: 239-246.
Rywin´ska A, Juszczyk P, Wojtatowicz M, Rymowicz W. 2011. Chemostat study of citric acid production from glycerol by *Yarrowia lipolytica*. Journal of Biotechnology, 152: 54–57.
Papanikolaou S Muniglia L I, Chevalot I, Aggelis, G, Marc, I. 2002. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. Journal of Applied Microbiology, 92: 737-744.
Papanikolaou S, Faka S, Fick M, Chevalot I, Panayotou M G, Komaitis M, Marc I, Aggelis G. 2008. Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. Biomass and Bioenergy, 32: 60-71.
Pastore NS, Hasan SM, Zempulski DA. 2011. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose. Engevista, 13:149-159
Sá, TMN. 2011. Produção de ácido cítrico utilizando glicerol residual da produção de biodiesel como substrato. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
Silva GP, Mack M, Contiero J. 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. Biotechnology Advances, 27: 30-39.
Silva GKC, Ramalho SA, Gualberto NC, Gomes EB, Miranda RCM, Narain N. 2012. Utilização de resíduo agroindustrial como matéria-prima para a produção de ácido cítrico por *Kluveromyces marxianus* URM 4404. Scientia Plena, 8: 1-6.
Silva LVS, Ribeiro R, Amaral PFF, Coelho MAZ, Pessoa FLP. 2009. Produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* a partir de glicerol em condições limitantes de nitrogênio. Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal. Anais.Natal: UFRN, 2009.
Soccol CR, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Pandey A. 2006. New perspectives for citric acid production and application. Food Technology Biotechnology, 44: 141-149.
Tsiloyiannis VK, Kyriakis SC, Vlemmas J, Sarris K. 2001. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. Research in Veterinary Science, 70: 287-293.
Timeis- Technology innovation management and entrepreneurship information service. Citric acid. Índia, 2000. Disponível em: <http://www.technopreneur.net/timeis/index.htm> Acesso em: 29 out. 2012.
Vandenberghe LPS, Soccol CR, Pandey A, Lebeault JM. 1999. Review: Microbial production of citric acid, ***Brazilian*** Archives of ***Biology*** and ***Technology, 42:*** 263–276.

ACKNOWLEDGMENTS
The authors are grateful to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) for their scholarship support and financial support.

Efecto de la incorporación de biomasa de espirulina sobre la calidad de las pastas secas

Rodríguez De Marco ME [1,2], Steffolani ME [1,2], León AE [1,2]

1: Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ICYTAC-CONICET
2: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
erodriguezdemarco@agro.unc.edu.ar

Resumen: El objetivo del trabajo fue evaluar la calidad de pastas secas laminadas sustituidas con cantidades crecientes de espirulina. A cada una de las pastas se les determinó el tiempo óptimo de cocción, la absorción de agua, el índice de hinchamiento, el porcentaje de residuo luego de la cocción, el color y el contenido de proteínas tanto en la pasta cruda como en la pasta cocida. Se observó que el tiempo óptimo de cocción disminuyó con el aumento del porcentaje de sustitución. El residuo de cocción aumentó con respecto al control en todos los casos, sin embargo no superó los valores máximos establecidos para pastas elaboradas a partir de sémola de trigo. Solo la pasta sustituida con un 20% de biomasa de espirulina modificó significativamente la absorción de agua y el índice de hinchamiento con respecto a la pasta control. El contenido de proteínas de las pastas elaboradas con espirulina aumentó a medida que se incrementó el nivel de sustitución, no observándose diferencias significativas entre las muestras seca y cocida. Las pastas con espirulina presentaron un color verde oscuro con bajos valores de L*, a* negativo y b* positivo. La sustitución de harina de trigo por biomasa de espirulina en pastas laminadas puede ser utilizada para mejorar la calidad nutricional sin modificar los parámetros de calidad de cocción.

Palabras clave: pastas secas, espirulina, proteínas.

Abstract: The aim of the present study was to evaluate the quality of pastas sustituted with increasing amount of spirulina biomass. Optimum cooking time (OCT), cooking loss, water absorption, swelling index, color in raw pasta and the protein content, in raw and cooked pasta, were determined. OCT decreased with increasing spirulina level. Pasta prepared with spirulina present cooking loss higher than the control, but not exceeds the expected values for durum wheat pasta. The incorporation of the spirulina in pastas did not change water absorption and swelling index significantly ($p > 0.05$) up to 20% of substitution. Protein content increased with increasing spirulina content, but there was no significant difference ($p > 0.05$) between raw and cooked pasta. Color of pastas with spirulina showed a negative a*, positive b* and a decrease in the lightness, leading to green. The results obtained in this work indicate that the use of spirulina in pasta can enhance the nutritional quality without affecting its cooking proprieties.

Keywords: pasta, spirulina, protein

INTRODUCCIÓN

Las microalgas representan una de las fuentes más prometedoras para la obtención de sustancias nutracéuticas e ingredientes funcionales (Pulz y Gross 2004). Si bien, han sido utilizadas durante siglos por diferentes poblaciones como alimento, actualmente se cultivan como fuente de moléculas altamente valiosas como son los ácidos grasos poliinsaturados, pigmentos, antioxidantes y otros componentes bioactivos. La espirulina es una cianobacteria, que se la considera una microalga debido a su estructura filamentosa. Está ampliamente distribuida en el mundo y es comercializada como suplemento nutricional para humanos y como aditivo en la alimentación animal debido principalmente a su elevado contenido de proteínas, entre el 50 y 70% de su peso seco. Esta cianobacteria contiene todos los aminoácidos esenciales, sin embargo, el contenido de metionina, lisina y cistina es reducido comparado con otras fuentes de proteínas como la leche, el huevo y la carne; pero es superior al contenido de dichos aminoácidos en proteínas de origen vegetal, como las legumbres (Habib *et al*. 2008). Además, la espirulina es una fuente de vitaminas, especialmente vitamina B12 y provitamina A (beta-caroteno); minerales, especialmente el hierro; y es una de las pocas fuentes de ácido γ linolénico (Belay *et al.* 1993).

Las pastas ocupan un lugar importante en la dieta de la sociedad moderna. Son productos de gran aceptación por parte del consumidor debido a sus atributos sensoriales, bajo costo, larga duración, fácil preparación y transporte (Marchylo y Dexter 2001). Desde el punto de vista nutricional, son consideradas una fuente de energía debido a su elevado contenido de carbohidratos, siendo un producto de bajo índice glicémico

(Tudorica *et al*. 2002). Sin embargo, el aporte de proteínas es pobre (<15%), con un bajo nivel de lisina, aminoácido esencial. Por esta razón, se ha intentado elaborar pastas sustituyendo la harina de trigo con diversas fuentes proteicas para mejorar sus propiedades nutritivas, como harina de soja, aislados de soja, derivados lácteos, proteínas del suero y concentrados proteicos de levaduras (Torres *et al.* 2007). Prabhasankar *et al.* (2009) y Fradique *et al.* (2010) en sus trabajos de investigación utilizaron macro y micro-algas como fuente de compuestos bioactivos en la formulación de pastas frescas extruidas, pero no hay antecedes del estudio del efecto de biomasa de espirulina en pastas secas laminadas. La sustitución parcial de la harina de trigo o el agregado de ingredientes funcionales en la formulación de las pastas pueden afectar las propiedades de cocción, por lo que es importante evaluar los cambios producidos que influyen en la aceptación del consumidor y en la calidad del producto final (Lee *et al.* 2002). El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad de pastas secas laminadas sustituidas con cantidades crecientes de biomasa de espirulina, con la intención de mejorar el perfil nutricional del producto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó una harina de trigo pan (*Triticum aestivum*) comercial provista por Industria Alimenticia Tiranti (Córdoba, Argentina) y biomasa de espirulina seca en polvo comercial (Spirulina Spirel, Cuba).

Composición de la harina de trigo pan y de la biomasa de espirulina

Se determinó el contenido de humedad a 130°C por 2 h (AACC 44-15, 1995), el contenido de proteínas por el micro-método de kjeldahl (AACC 46-30, 1995), el contenido de ceniza calcinando 2g de muestra a 600°C durante 8 h, mufla Inderf® Argentina, (AACC 08-01, 1995), y el contenido de lípidos mediante una extracción continua con hexano por Soxhlet (AACC 32-26, 1995). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. El valor de hidratos de carbono se obtuvo por diferencia.

Elaboración de pastas secas laminadas

Se elaboraron las pastas sustituyendo harina de trigo pan por biomasa de espirulina seca en un 5, 10 y 20% (E5, E10 y E20, respectivamente). Se elaboró además pasta control con 100% de harina de trigo pan. Las pastas fueron preparadas a partir de 50 g de las mezclas, una cantidad óptima de agua destilada determinada experimentalmente (22 ml) de manera que permita obtener una masa con las características apropiadas para el posterior laminado, y 1% de NaCl previamente disuelto en el agua. Se amasó la pasta con una amasadora manual Philips 190W HR 1495 (Argentina) a máxima velocidad durante 3 minutos. Posteriormente se armó un bollo con las manos y se dejó reposar durante 10 minutos. El proceso de laminado se realizó con una fabricadora de pastas Pastalinda (Argentina), con apertura regulable de rodillos del 1 al 9. Durante el laminado, se hizo pasar la muestra por el rodillo en máxima apertura (1), se realizó un pliegue de la masa por la mitad, y se volvió a pasar por los rodillos en la misma apertura. Esta operación se repitió 7 veces y luego se pasó la muestra solo una vez por los siguientes niveles inferiores de apertura. Para finalizar se pasó una vez mas por los rodillos en su mínima apertura, y se pasó por los rodillos cortantes para obtener una muestra de 2 mm de ancho. Por última, las pastas fueron sometidas a un proceso de pre-secado durante 30 min a 30°C con corriente de aire, y luego secadas en cámara cerrada con control de humedad (75%) a 45°C por 17 h. Las muestras fueron almacenadas en bolsas de polietileno, en un contenedor hermético a temperatura ambiente hasta el momento de uso.

Parámetros de calidad de cocción

Tiempo óptimo de cocción

El tiempo óptimo de cocción (TOC) se determinó sobre 4 gramos de pasta cruda, cortada en piezas de 5 cm, que fueron cocinados en 200 ml de agua destilada hirviendo. En intervalos de 1 min a partir del momento que fueron colocadas en ebullición se tomó una porción de la pasta y se la comprimió en dos portaobjetos. El tiempo transcurrido hasta la desaparición del centro blanco de la pasta fue el TOC.

Índice de hinchamiento

El índice de hinchamiento se determinó como la diferencia de peso entre la pasta cocida hasta el TOC (P1) y la misma pasta sometida a un proceso de secado hasta peso constante a 105°C (P2). El resultado se expresó según la ecuación (Tudôrica *et al.* 2002):

$$IH = (P1-P2)/P2$$

Absorción de agua
La absorción de agua se determinó como la diferencia de peso entre la pasta cocida (P3) y la pasta cruda (P4), expresada como porcentaje (Tudôrica *et al*. 2002):

$$AA = (P3-P4)/P4x100$$

Residuo de cocción
El porcentaje de residuos luego de la cocción se determinó por evaporación del agua de cocción a peso constante en estufa a 105°C. El residuo obtenido fue pesado y expresado como porcentaje de la muestra de la pasta original.

Color de la pasta fresca y la pasta seca
La determinación del color de la pasta fresca se hizo sobre la lámina de masa reducida a su menor espesor previo al corte, cubierto con un vidrio de baja reflectancia. Para la pasta seca se ordenaron cinco fragmentos de pasta de 5 cm de manera paralela, sobre un fondo negro y cubiertos con un vidrio de baja reflectancia. Se utilizó un espectrofotómetro de reflectancia Minolta 508d (EEUU) de 8 mm de apertura, ángulo observador 10°, iluminante D65, componente especular incluido, por medio de la escala CIE-Lab. Los resultados fueron expresados en términos de L*, luminosidad; a*, rojo-verde; b* amarillo-azul.

Contenido de proteínas de las pastas secas y las pastas cocidas
El contenido de proteínas totales de las muestras de pasta seca y las pastas cocida se determinó según el método de micro-kjeldahl (46-13, AACC 1995).

Análisis Estadístico
El análisis estadístico se realizó mediante el programa INFOSTAT (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina). En todos los casos se realizaron las determinaciones por triplicado y los resultados se informaron como el valor promedio ± la desviación estándar. Los datos obtenidos se trataron estadísticamente mediante un análisis de varianza y los resultados fueron comparados por el Método de la Mínima Diferencia Significativa (LSD) de Fisher a un nivel de significación < 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición de harina de trigo y biomasa de espirulina
La composición de la harina de trigo y la biomasa de espirulina utilizadas en la elaboración de las pastas se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Composición de harina de trigo y biomasa de espirulina

Muestra	Humedad	Proteínas	Lípidos	Cenizas	Hidratos de Carbono
Harina de trigo	12,98±0,09	13,37±0,03	0,9±0,2	0,54±0,01	72,21±0,3
Biomasa de espirulina	12,15±0,08	67,82±1,71	1,62±0,3	11,27±0,04	7,14±2,00

*Valores expresados en g/100 g de muestra

Como se observa en la tabla, la biomasa de espirulina posee un alto contenido de proteínas, resultado que coincide con datos publicados por diversos autores (Clément *et al.* 1967, Belay *el al.* 1993, Habib *et al.* 2008).

Parámetros de calidad de cocción
Los valores obtenidos de los parámetros de calidad de cocción de la pasta control y las pastas sustituidas con biomasa de espirulina se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Parámetros de calidad de cocción de pastas

Muestra	Tiempo óptimo de cocción (min)	Índice de Hinchamiento	Absorción de agua (g/100g pasta)	Residuo de cocción (g/100g pasta)
Control	11,30	1,98±0,02 a	148,70±1,82 a	4,97±0,03 a
E5	10,00	1,94±0,04 a	142,79±3,36 a	5,72±0,25 b
E10	10,00	1,95±0,05 a	145,45±3,80 a	5,90±0,15 b
E20	9,00	2,09±0,08 b	158,47±7,34 b	7,39±0,19 c

*Letras distintas dentro de la misma columna indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que el tiempo óptimo de cocción de las pastas disminuyó a medida que se aumentó el porcentaje de sustitución de la harina por biomasa. Considerando que el TOC depende principalmente de la penetración del agua de cocción en el interior de la pasta y de la siguiente gelatinización del almidón (Edwards *et al.* 1993), el agregado de biomasa de espirulina estaría generando la formación de una estructura más abierta en donde el agua de cocción ingresa más fácilmente y la gelatinización se lleva a cabo más rápidamente, resultando en tiempos de cocción más cortos.

El residuo de cocción es uno de los parámetros más importantes que afectan la aceptación por parte del consumidor, por lo que es considerado un indicador de la calidad de la pasta cocida. Las pastas sustituidas con espirulina mostraron valores significativamente mayores ($p < 0,05$) de residuo de cocción con respecto a la muestra control. Se encontraron resultados similares en trabajos anteriores sobre pastas elaboradas con macro-algas comestibles (wakame, *Undaria pinnatifida*) y en productos elaborados a partir de harina de trigo, similares a las pastas, con concentrados proteicos de soja y trigo (Prabhasankar *et al.* 2008, Prabhasankar *et al.* 2007). El aumento del residuo de cocción puede indicar, junto con los menores tiempos de cocción, que la biomasa de espirulina interfirió en la estructura de la pasta debilitando la red de proteínas y haciendo que se pierda mayor cantidad de amilosa. Doxastakis *et al.* (2007) trabajaron en espaguetis enriquecidos con proteínas de lupin blanco y encontraron aumentos en el residuo de cocción de las pastas enriquecidas con respecto al control, concluyendo que el aislado de las proteínas de lupin debilitaba la fuerza del gluten y, por lo tanto, la estructura de los espaguetis. Sin embargo, todos los valores de residuos de cocción obtenidos se encuentran por debajo del 7-8%, valores límites establecido para una pasta elaborada a partir de sémola de trigo (Dick, Youngs 1988), por lo que las pastas pueden ser consideradas de buena calidad.

La absorción de agua y el índice de hinchamiento son importantes en la evaluación de la calidad de las pastas, a menores valores se consideran pastas de mejor calidad. Sólo las pastas con un 20% de sustitución de espirulina presentaron valores significativamente mayores ($p < 0,05$) que la muestra control en estos parámetros.

Color de la masa fresca y las pastas secas

El color de las pastas (**Tabla 4**.) es un importante factor de calidad para los consumidores. Las pastas elaboradas a partir de sémola de trigo presentan un color amarillo, derivado del beta-caroteno. En los últimos años, se han elaborado pastas con ingredientes vegetales, como la espinaca, el tomate y la zanahoria, que le otorgan al producto un color diferente al convencional. La sustitución de la harina de trigo con biomasa de espirulina resultó en un producto con coloración similar a las pastas con vegetales. A partir de la medición instrumental del color, se observó que tanto en la masa fresca como en la pasta luego del proceso de secado, a medida que se aumentó el contenido de biomasa de espirulina, se produjo una disminución en la luminosidad, y las pastas sustituidas presentaron un valor de a* negativo y b* positivo, tendiendo al color verde. Esto es debido al alto contenido de pigmentos de la espirulina, principalmente clorofila.

Tabla 4. Color de las pastas fresca y seca

	L	a*	b*
Pasta fresca			
Control	74,31±1,12 a	1,02±0,09 a	14,81±0,17 a
E5	38,32±1,34 b	-18,49±0,25 b	10,08±0,15 b
E10	30,69±0,35 c	-15,44±0,68 c	7,67±0,48 c
E20	25,68±0,64 d	-11,62±0,28 d	5,46±0,17 d
Pasta Seca			
Control	61,83±2,64 e	1,85±0,07 e	16,84±0,64 e
E5	28,34±1,02 f	-9,12±0,33 f	5,90±0,34 d
E10	24,95±0,70 d	-6,76±076 g	4,17±0,64 f
E20	23,53±0,48 g	-5,73±0,75 h	3,24±0,34 g

*Letras distintas dentro de la misma columna indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$

Contenido de Proteínas de pastas secas y pastas cocidas

El contenido de proteínas (**Tabla 3**.) aumentó significativamente a medida que se incrementó el porcentaje de sustitución de la harina por la biomasa de espirulina. Fradique *et al.* (2010) informaron que el contenido de proteínas en pastas frescas enriquecidas con *Spirulina maxima* disminuía luego de la cocción con respecto al de las pastas crudas. En este trabajo, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las pastas crudas y las pastas cocidas. El contenido de proteínas en las pastas cocidas fue ligeramente mayor que en las pastas crudas, posiblemente debido a un efecto de concentración originado por la pérdida de amilosa en el residuo de cocción.

Tabla 3. Contenido de Proteínas

	Proteínas pasta cruda (%bs)	Proteínas pasta cocida (%bs)
Control	12,91±0,03 a	13,09±0,23 a
E5	15,43±0,12 b	15,73±0,22 b
E10	18,02±0,13 c	18,46±0,29 c
E20	23,49±0,52 d	23,74±0,18 d

*Letras distintas indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$

CONCLUSION

La incorporación de biomasa de espirulina en la formulación de pastas secas laminadas produjo un aumento del contenido de proteínas y los parámetros de calidad de cocción no se vieron afectados en gran medida.
Se obtuvieron pastas secas con una calidad tecnológica aceptable y con una calidad nutricional notablemente mejorada.

BIBLIOGRAFÍA

AACC. American Association of Cereal Chemistry. 1995. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 9th Ed., American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. USA.

Belay A, Ota Y, Miyakawa K and Shimamatsu H. 1993 Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. *J Appl Phycol* 5:235-41

Clément G, Giddey C, Menzi R. 1967. Amino acid composition and nutritive value of the alga *Spirulina Maxima*. *J Sci Food Agric* 18:497-501

Dick J.W., Youngs V.L. 1988. Evaluation of durum wheat, semolina and pasta in the United States; en Fabriani G. y Lintas C. editores, Durum Wheat Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. Pág. 237-248

Doxastakis G, Papageorgiou M, Mandalou D, Irakli M, Papalamprou E, D'A´ gostina A, et al,. 2007. Technological properties and non-enzymatic browning of white lupin protein enriched spaghetti. *Food Chem* 101:57–64

Edwards NM, Izydorczyk MS, Dexter JE, Biliaderis CG. 1993. Cooked pasta texture: comparison of dynamic viscoelastic properties to instrumental assessment of firmness. *Cereal Chem* 70:122-126

Fradique M, Batista AP, Nunes MC, Gouveia L, Bandarra NM, Raymundo A. 2010. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta product. Part 1: Preparation and evaluation. *J Sci Food Agric* 90:1656-1664

Habib AB, Parvin M, Huntington TC, Hasan MR .2008. A review on culture, production and use of spirulina as food for human and feeds for domestic animals and fish. FAO fisheries and aquaculture circular N° 1034, Rome, Italy, 41pp.

Lee SJ, Rha M, Kho W, Park W, Lee C, Kwon YA and Hwang J. 2002. Measurement of Cooked Noodle Stickiness Using a Modified Instrumental Method. *Ceral Chemistry*, 79(6):838-842

Marchylo BA, Dexter JE. 2001. Pasta production in Cereals Proccesing Technology, ed. By Owens G. CRC. Press, Boca Raton, FL, pp.109.130

Prabhasankar P, Jyotsna R, Indrani D, Rao GV. 2007. Influence of whey protein concentrate, additives, their combinations on the quality and microstructure of vermicelli made from Indian *T. Durum* wheat variety. *Journal of Food Engineering* 80 (4), 1239-1245

Prabhasankar P, Ganesan P, Bhaskar N, Hirose A, Nimishmol S, Lalitha RG, Hosokawa M, Miyashita K. 2008. Edieble Japanese seaweed, wakame (*Undaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta: Chemical, functional and structural evaluation. *Food Chem* 115:501-508

Pulz O, Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 635-648

Torres A, Frias J and Granito, M. 2007. Germinates Cajanus cajan seeds as ingredients in pasta products: Chemical, biological and sensory evaluation. *Food Chem* 101(1),202-211

Tudoricâ C.M., Kuri V., Brennan C.S. 2002. Nutritional and physicochemical characterristics of dietary fiber enriched pasta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 347-356

Producción de una poligalacturonasa con capacidad macerante de tejidos vegetales por *Wickerhamomyces anomalus* en un medio sintético

Zubreski E.R., Butiuk A.P., Cruz N.E., Martos M.A.

Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones, Argentina.
amartos@fceqyn.unam.edu.ar

Resumen: El objetivo de este trabajo fue formular un medio de cultivo de bajo costo, que contenga los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento y la expresión de la enzima poligalacturonasa (PG) por *Wickerhamomyces anomalus.* Se formuló un medio de cultivo sintético (MS). Se evaluó la influencia de los factores nutricionales (vitaminas, aminoácidos y fuente de nitrógeno) sobre el crecimiento y la expresión de la enzima. Los estudios se realizaron eliminando los componentes del medio de a uno por vez mientras se mantenía la concentración de los otros constantes. La producción de PG alcanzó un valor de ~ 50 UE/ml a las 8 h de cultivo en el medio MS. El crecimiento de *W. anomalus* fue despreciable en ausencia de biotina, pantotenato de calcio, piridoxina o tiamina. La omisión de los aminoácidos triptófano, histidina y metionina en el medio de cultivo, ocasionó una disminución en la producción de PG. No hubo diferencia significativa en los medios que contenían sulfato de amonio y urea. La actividad PG obtenida en el medio MS que contenía las cuatro vitaminas esenciales fue de ~49 UE/ml, a las 8 h de cultivo. Fue posible obtener sobrenadantes con elevada actividad PG en un medio sintético y de bajo costo.

Palabras claves: *Wickerhamomyces anomalus,* poligalacturonasa, factores nutricionales.

Abstract: The aim of this work was to formulate a culture medium of low cost, which contains the nutritional requirements for growth and the expression of the enzyme polygalacturonase (PG) by *Wickerhamomyces anomalus*. A synthetic culture medium (MS) was formulated. The influence of nutritional factors (vitamins, amino acids and nitrogen source) on growth and expression of the enzyme was evaluated. The studies were conducted by removing medium components one at a time while keeping all others constant. PG production at 8 h of culture on MS medium was ~ 50 EU/ml. The growth of *W. anomalus* was negligible in the absence of biotin, calcium pantothenate, pyridoxine or thiamine. The omission of the amino acids tryptophan, histidine and methionine in the medium, caused a decrease in the production of PG. No significant difference was observed in media containing ammonium sulfate and urea. The PG activity obtained in MS medium containing four essential vitamins was ~ 49 EU/ ml at 8 h of culture. It was possible to obtain supernatants with high PG activity in a synthetic and low cost medium.

Keywords: *Wickerhamomyces anomalus,* polygalacturonase, nutritional requirements.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas pecticas o pectinasas son las responsables de la degradación de las sustancias pécticas presentes en la laminilla media y en la pared celular primaria de las plantas superiores. Según su modo de acción se clasifican en: poligalacturonasa (PG), pectinesterase (PE), pectinliasa (PL) y pectatoliasa (PAL). Estas enzimas juegan un importante rol en la industria de alimentos, principalmente en el procesamiento de jugos de frutas y en la maceración de tejidos vegetales (Jayani *et al*. 2005, Tari *et al*. 2007). Algunas pectinasas tienen la capacidad de hidrolizar restringidamente la protopectina presente en los tejidos vegetales, liberando pectina soluble con la consiguiente separación de las células sin producir mayores daños, proceso denominado maceración. De este modo, se desea que dichas células conserven muchos de sus compuestos intracelulares, entre los cuales se cuentan; carotenoides, vitaminas (C, B_6, B_9 y E) y flavonoides. Todos estos compuestos poseen reconocidos beneficios directos sobre la salud (Aranceta 2003). El proceso de maceración mediante enzimas pécticas es empleado en la industria alimenticia para la obtención de néctares de frutas como peras, duraznos, damascos, frutillas; y de purés de vegetales como papa, zanahoria, aji rojo y otros, que se emplean en la alimentación de bebés y adultos mayores (Pilnik y Voragen 1991).

Las enzimas pécticas son producidas por una gran variedad de microorganismos como hongos filamentosos, levaduras y bacterias (Souza *et al*. 2003, da Silva *et al*. 2005). Las levaduras representan una fuente alternativa para la producción a gran escala de enzimas comerciales. Las levaduras son organismos

unicelulares por lo que su crecimiento es relativamente simple y fácil de cambiar de escala y a muchas de ellas se las considera como microorganismos GRAS (Generally recognized as safe) (da Silva *et al*. 2005). Teniendo en cuenta que el costo de los medios de fermentación es uno de los factores determinantes en la producción de enzimas pécticas, es importante formular medios de cultivos con el menor costo posible y que al mismo tiempo provean los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento adecuado del microorganismo y la producción enzimática (Nighojkar *et al*. 2006). El estudio de la formulación de medios de cultivos para el crecimiento de los microorganismos, ha sido objeto de estudio de numerosos trabajos tendientes a disminuir los costos de producción del metabolito de interés, especialmente cuando no se tiene conocimiento de los requerimientos nutricionales de la cepa en estudio. Los medios de cultivos definidos son convenientes porque brindan no solo reproducibilidad al sistema, sino también pureza para las proteínas que son secretadas al medio.

Wickerhamomyces anomalus, reciente re-clasificación de la especie *Pichia anomala* (Kurtzman *et al*. 2008), es una levadura autóctona aislada a partir de frutas cítricas, en la Provincia de Misiones, Argentina. Esta levadura, al crecer en medio Yeast Nitrogen Base (YNB) suplementado con glucosa y pectina de citrus, produce en forma asociada al crecimiento, una enzima con actividad poligalacturonasa (51 UE/mL). Esta enzima es de gran importancia industrial ya que posee actividad PPasa o capacidad macerante de tejidos vegetales. El medio YNB es un medio de elevado costo (aproximadamente $ 290, los 100 g), no apto para la producción a mayor escala.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el crecimiento y la expresión de la enzima PG, en un medio de cultivo sintético y de bajo costo, en reemplazo del medio YNB y estudiar el efecto que cada uno de los componentes del medio de cultivo ejercen sobre la expresión de la enzima.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo

W. anomalus, aislada a partir de frutas cítricas en la provincia de Misiones, Argentina.

Medios de cultivos

Medio de conservación (medio YM): Extracto de levadura, 5 g/l; triptona, 5 g/l; glucosa, 10 g/l; agar, 18 g/l, pH 5,0.

Medio de fermentación:

a) Medio sintético (MS): glucosa (Britania), 5 g/l; pectina (Parafarm), 5 g/l; $(NH_4)_2SO_4$, 3 g/l; KH_2PO_4, 1 g/l; $MgSO_4$, 0,5 g/l; $CaCl_2$, 0,1 g/l; solución de vitaminas, 1 ml/l; solución de aminoácidos, 10 ml/l; solución de microelementos , 1 ml/l; pH 5,0.

La fuente de carbono y energía (FCE) (pectina y glucosa), el sulfato de amonio, los fosfatos, el resto de las sales ($MgSO_4$, $CaCl_2$, solución de microelementos) y los aminoácidos, fueron esterilizados por separado, en autoclave 15 min a 121 ºC, previo ajuste del pH a 5,0. La solución de vitaminas se esterilizó por filtración utilizando membranas de nitrato de celulosa de 0,22 μm de tamaño de poro (Sartorius).

b) *Medio MS_1:* igual composición que el medio MS pero conteniendo 2,5 g/l de pectina.

Fermentación

Se inocularon frascos Erlenmeyers de 500 ml que contenían 95 ml del medio de fermentación con 5 ml de una suspensión de un cultivo joven de *W. anomalus* (24 h) en agua destilada estéril (DO_{620} = 0,96). Los mismos se incubaron a 30 °C con agitación (180 rpm) durante 24 h (precultivo). Al cabo de este tiempo se tomaron 5 ml y se inocularon los siguientes erlenmeyers, los que se incubaron bajo las mismas condiciones hasta 10 h. Se fueron tomando muestras en función del tiempo, las que fueron centrifugadas a 2350 × *g* por 10 min, a 5 ºC, para remover las células de levaduras. Los sobrenadantes, denominados extractos enzimáticos (EE), se mantuvieron a – 18 °C hasta su utilización como fuente de enzima extracelular. Las experiencias se realizaron por triplicado y se tomaron para los cálculos los valores promedios.

Estudio de los factores nutricionales sobre el crecimiento de *P. anomala* y la producción de PG

Efecto de las vitaminas

Para estudiar el efecto de las vitaminas sobre el crecimiento de *W. anomalus* se realizaron una serie de cultivos sólidos en medio MS, omitiendo la adición de una vitamina en cada experiencia, lo que permitió evaluar la influencia de ese único nutriente. Para ello se prepararon 9 medios de cultivos denominados

MS_2 a MS_{10} (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**Tabla 1). A partir de una estría joven de a levadura en estudio, se sembraron Cajas Petri, que contenían el correspondiente medio. Las Cajas Petri se incubaron a 30 ºC y cada 24 h se realizaron repiques sucesivos durante 4 días.

Tabla 1: Soluciones de vitaminas para los medios MS_2 a MS_{10}

Vitamina	MS_2	MS_3	MS_4	MS_5	MS_6	MS_7	MS_8	MS_9	MS_{10}
Biotina	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Pantotenato de Ca	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Ac. Fólico	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Niacina	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Ac. *p*-aminobenz.	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Piridoxina	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Riboflavina	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Tiamina	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Efecto de los aminoácidos

Para estudiar el efecto de los aminoácidos sobre el crecimiento de *W. anomalus* y la expresión de PG, se realizaron una serie de cultivos en medio MS líquido, omitiendo la adición de un aminoácido en cada experiencia. Se prepararon 3 medios de cultivos denominados MS_{11} a MS_{13}, según se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2: Soluciones de aminoácidos para los medios MS_{11} a MS_{13}

Aminoácido	MS_{11}	MS_{12}	MS_{13}
Histidina	+	+	-
Metionina	-	+	+
Triptófano	+	-	+

Las fermentaciones se realizaron según se describió anteriormente, realizándose dos pasajes sucesivos de 24 h en cada medio (precultivos) y evaluándose el crecimiento y la producción de la enzima en el 3º subcultivo. Las experiencias se realizaron por duplicado y se tomaron para los cálculos valores promedios.

Influencia de la fuente de nitrógeno

Para realizar este estudio, el medio MS fue suplementado con diferentes FN orgánicas e inorgánicas. Se utilizaron cantidades equivalentes en nitrógeno de sulfato de amonio, extracto de levadura (Sigma), triptona (BD) y urea.

Las fuentes de nitrógeno fueron esterilizadas por separado, en autoclave 15 min a 121 ºC, previo ajuste del pH a 5,0 a excepción de la urea la que fue esterilizada por filtración.

Las fermentaciones se realizaron en medio MS líquido, según se describió anteriormente. Las experiencias se realizaron por duplicado y se tomaron para los cálculos valores promedios.

Determinaciones analíticas

Determinación de la actividad poligalacturonasa (PG): La actividad PG se determinó midiendo los grupos reductores liberados mediante el método del DNS (Miller 1959).

Biomasa: El crecimiento microbiano se determinó por medidas de peso seco. Luego del proceso de centrifugación, las células fueron lavadas con agua destilada, centrifugadas y colocadas en estufa a 45 ºC, hasta peso constante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de poligalacturonasa por *W. anomalus* en medio sintético (MS)

En la Figura 1 se presentan los valores de actividad PG obtenidos en el transcurso de las fermentaciones de *W. anomalus* en los medios MS y MS_1.

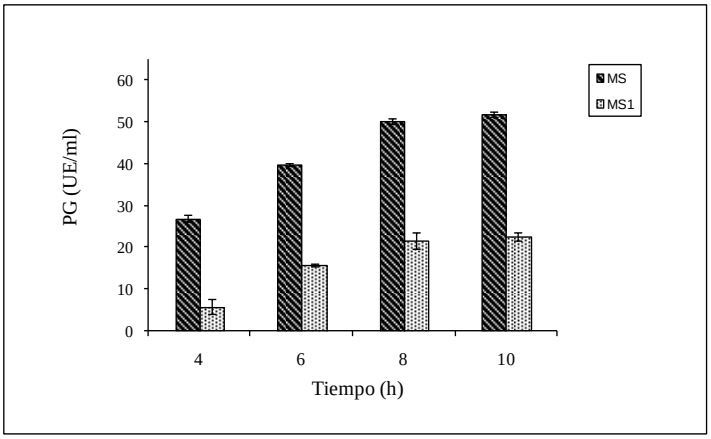


Figura 1: Producción de PG en los medios MS y MS_1 por *W. anomalus* a diferentes tiempos de fermentación.

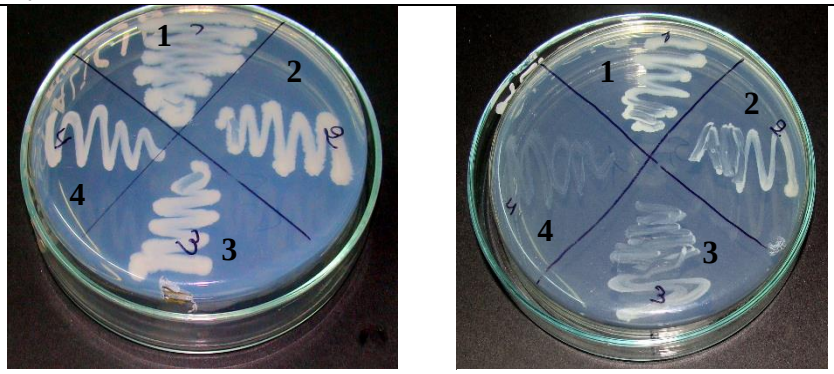
La producción de PG en medio MS alcanzó valores de 50 ± 0,73 UE/ml a las 8 h de cultivo, valores estos similares a los obtenidos en medio Yeast Nitrogen Base (~ 51 UE/ml). Los cultivos realizados en el medio MS_1 con pectina de citrus en una proporción del 50 % con respecto a los medios MS, arrojaron bajos valores de actividad PG (22 ± 0,50 UE/ml). Estos resultados indican la necesidad de un inductor (pectina) para estimular la producción de PG por la levadura en estudio.

Estudio de los factores nutricionales sobre el crecimiento de P. anomala y la producción de PG

Los resultados obtenidos al estudiar el efecto de las vitaminas sobre el crecimiento de *W. anomalus* en medio MS sólido, se presentan en la Tabla 3. En la Figura 2 se observa el crecimiento de *P. anomala* en los medios MS (con todas las vitaminas) y MS_2 (en ausencia de biotina).

Tabla 3: Efecto de la omisión de una vitamina en el medio MS sobre el crecimiento de *P. anómala*

Medio de cultivo	Vitamina ausente en el medio	Crecimiento
MS_2	Biotina	-
MS_3	Pantotenato de calcio	-
MS_4	Acido fólico	+
MS_5	Inositol	+
MS_6	Niacina	+
MS_7	Ac. *p*-aminobenzoico	+
MS_8	Piridoxina	-
MS_9	Riboflavina	+
MS_{10}	Tiamina	-



Medio MS Medio MS en ausencia de biotina

Figura 2: Efecto de las vitaminas sobre el crecimiento de *P. anomala*. Los números corresponden al número del repique sucesivo realizados.

El crecimiento de *W. anomalus* fue despreciable en ausencia de biotina, pantotenato de calcio, piridoxina o tiamina (Tabla 3).
Como se observa en la Figura 2, el crecimiento de la levadura en medio MS sin biotina (MS_2) fue disminuyendo con los repiques sucesivos, siendo despreciable en el 4° repique, mientras que en presencia de todas las vitaminas (medio MS) se observó un crecimiento abundante en los 4 repiques. Un comportamiento similar se observó cuando se repitió el ensayo en ausencia de pantotenato de calcio, piridoxina o tiamina. En estudios previos se demostró que la enzima PG está asociada al crecimiento, por lo tanto las 4 vitaminas que resultaron esenciales para el crecimiento deben estar presentes en el medio de cultivo para lograr un buen desarrollo de la levadura y por lo tanto una buena producción de la enzima de interés.
Los resultados de actividad PG y biomasa, obtenidos por *W. anomalus* en los distintos medios MS, a cada uno de los cuales se le omitió la adición de un aminoácido, se presentan en la Figura 3.

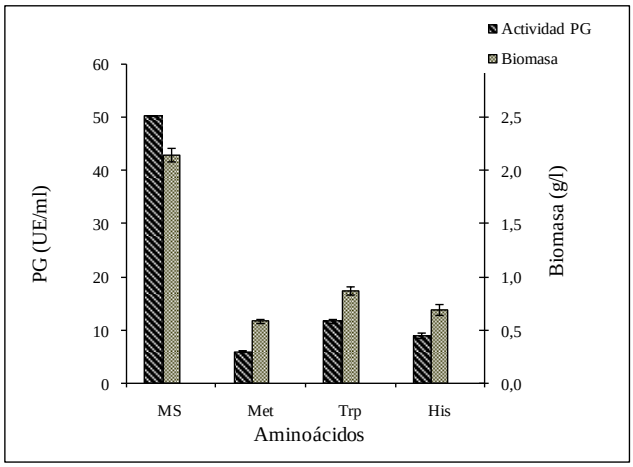


Figura 3: Efecto de la omisión de un aminoácido en el medio MS sobre la actividad PG y la producción de biomasa por *W. anomalus*.

Se observa que la omisión de los aminoácidos en el medio de cultivo provocó una disminución en el crecimiento microbiano y por lo tanto en la producción de PG. La omisión de los aminoácidos en el medio MS produjo una disminución del 77, 83 y 88 % en la producción de PG para triptófano, histidina y metionina, respectivamente (Fig. 3).
En la Figura 4 se presentan los valores de actividad PG obtenidos por *W. anomalus* a las 8 h de cultivo en medio MS, al utilizar diferentes fuentes de nitrógeno.

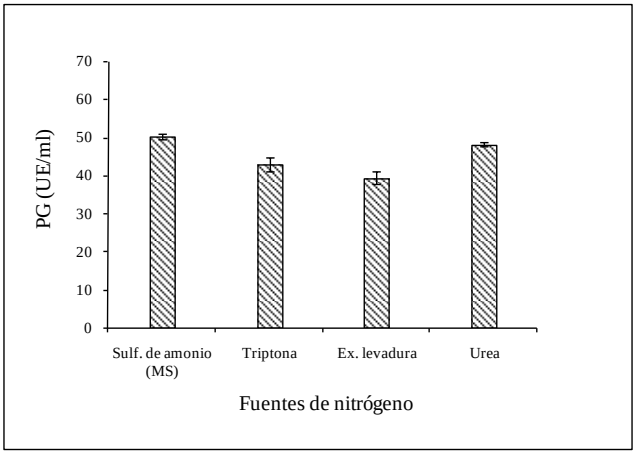


Figura 4: Producción de PG por *W. anomalus* a las 8 h de cultivo en medio MS, utilizando diferentes fuentes de nitrógeno.

Según el análisis de varianza (datos no mostrados) la FN influyó significativamente en la producción de PG, siendo el nivel de significación (p) menor a 0,05 para el 95 % del nivel de confianza. Como se observa en la Figura 4, al utilizar en los medios de cultivos fuentes complejas de nitrógeno, como triptona o extracto de levadura, la actividad PG en los EE fue de 43 ± 1,83 y 39,34 ± 1,71, respectivamente. Estos valores fueron inferiores a los obtenidos con FN simples como sulfato de amonio (50 ± 0,73) o urea (48 ± 0,65).
Los menores títulos observados para la enzima al utilizar estas FN complejas hacen suponer que habría algún componente con efectos deletéreos sobre la producción enzimática. El extracto de levadura contiene una importante cantidad de sustancias complejantes y es posible que su utilización en el medio de cultivo disminuya la disponibilidad de ciertos metales indispensables para la expresión de la enzima (Ferreyra *et al*. 2002).
Durante la producción de la enzima fitasa con una cepa de *P. anomala*, utilizando un medio de cultivo compuesto por melaza de caña al cual se le adicionaron FN complejas (extracto de levadura, triptona, peptona, extracto de carne) o simples (sulfato de amonio, urea, nitrato de sodio, nitrato de amonio), los mayores valores de actividad enzimática se obtuvieron con urea. Con sulfato de amonio se obtuvieron valores menores, aunque estos fueron superiores al medio que contenía extracto de levadura (Kaur y Satyanarayana 2005).
Por el contrario, el comportamiento inverso al anterior es más frecuente, particularmente con enzimas pécticas. Por ejemplo, se informó que *K. lactis* aumentó la producción de pectinasas en un medio de cultivo suplementado con una FN orgánica tal como extracto de levadura o peptona, pero no varió al utilizar una FN inorgánica (Blanco *et al*. 1999).

Producción de PG en el medio de cultivo optimizado
En base a los resultados que se obtuvieron al analizar el efecto de los diferentes componentes que conforman el medio MS, se formuló un medio de cultivo al que se lo denominó MSO (medio MS optimizado), cuya composición era la correspondiente al medio MS pero conteniendo únicamente las 4 (cuatro) vitaminas que resultaron esenciales para el crecimiento de *W. anomalus*.
Los valores de actividad PG de los sobrenadantes de los cultivos obtenidos a las 8 h en el medio MSO, se presentan en la Figura 5 y se comparan con los valores obtenidos en los medios MS e YNB.

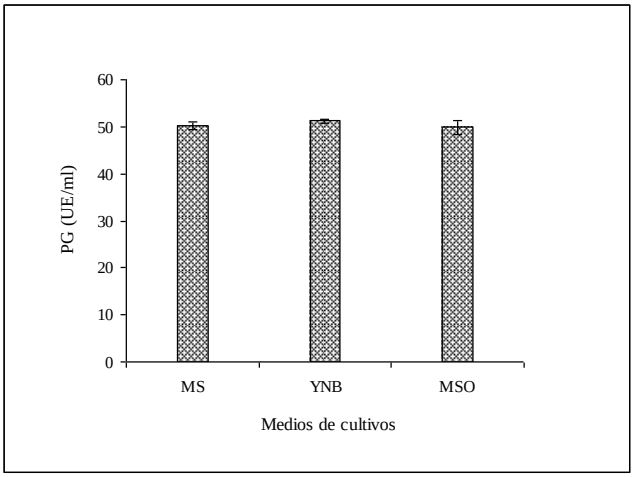


Figura 5: Valores de actividad PG obtenidos en los medios MS, YNB y MSO por *W. anomalus*.

Se obtuvieron valores de producción de PG de 49 ± 1,49 UE/ml, en el medio MSO, a las 8 h de cultivo, valores estos similares a los obtenidos en los medios MS e YNB (Fig. 5). Estos resultados muestran que la eliminación de 4 vitaminas del medio MS original manteniendo únicamente biotina, pantotenato de calcio, piridoxina y tiamina resulta en una producción enzimática equivalente con la consecuente disminución de costos y mayor simpleza de preparación.
Al hacer una estimación de costos para 4 l de medio de cultivo se obtuvo que el medio YNB tendría un costo de $ 86,0, mientras que el medio MSO de ~ $ 10.

CONCLUSIONES

La producción de PG alcanzó un valor de ~50 UE/ml a las 8 h de cultivo en un medio sintético (MS). El crecimiento de *W. anomalus* fue despreciable en ausencia de biotina, pantotenato de calcio, piridoxina o tiamina. La omisión de los aminoácidos triptófano, histidina o metionina en el medio de cultivo, ocasionaron una disminución en la producción de PG. Al utilizar en los medios de cultivo fuentes de nitrógeno complejas como triptona o extracto de levadura, la expresión de la enzima disminuyó. No hubo diferencia significativa en los medios que contenían sulfato de amonio o urea.

Fue posible obtener sobrenadantes con buena actividad PG mediante el crecimiento de *W. anomalus* en un medio sintético, de bajo costo, apropiado para la producción a mayor escala en reemplazo del medio Yeast Nitrogen Base, de elevado costo.

BIBLIOGRAFÍA

Aranceta J. 2003. Las frutas, verduras y hortalizas en la alimentación de los españoles. DETECOM, Madrid.

Blanco P, Sieiro C, Villa TG. 1999. Production of pectic enzymes in yeasts- mini review. FEMS Microbiology Letters, 175:1-9.

Da Silva EG, Borges MF, Medina C, Piccoli RH, Schwan RF. 2005. Pectinolytic enzymes secreted by yeast from tropical fruits. FEMS Microbiology Letter, 5:859-865.

Ferreyra OA, Cavalitto SF, Hours RA, Ertola RJ. 2002. Influence of trace elements on enzyme production: protopectinase expression by *Geotrichum klebahnii* strain. Enzyme and Microbial Technology, 31:498-504.

Jayani RS, Saxena S, Grupta R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes - a review. Process Biochemistry, 40:2931-2944.

Kaur P, Satyanarayana T. 2005. Production of cell-bound phytase by *Pichia anomala* in an economical cane molasses medium: Optimization using statistical tools. Process Biochemistry, 40:3095-3102.

Kurtzman CP, Robnett CJ, Basehoar-Powers E. 2008. Relationships among species of *Pichia*, Issatchenkia and Williopsis determined from multigene phylogenetic analysis and the proposal of Barnettozyma gen. nov., Lindnera gen. nov. and Wickerhamomyces gen. nov. FEMS Yeast Research, 8: 939–954.

Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31:426–428.

Nighojkar S, Phanse Y, Sinha D, Nighojkar A, Kumar A. 2006. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. Process Biochemistry, 41:1136-1140.

Pilnik W, Voragen AGJ. 1991. The significance of endogenous and exogenous pectic enzymes in fruit and vegetable processing. Food Enzymology. 1:303-336.

Souza JVB, Silva ES, Maia MLS, Teixeira MF. 2003. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavisporus* 2A.UMIDA.1. Process Biochemistry, 39:455-458.

Tari C, Gögus N, Tokatli F. 2007. Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. Enzyme and Microbial Technology, 40 (5):1108-1116.

Inocuidad

Estudio de la termorresistencia de la proteína Ara h1 de cacahuete. Determinación de los parámetros cinéticos y termodinámicos de su desnaturalización

Mercedes Montserrat [1], Fanny N. Navarro[2], Javier Fraguas[1], LourdesSánchez[1] y María D. Pérez[1]

1. Facultad de Medicina, Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad de Los Andes, Avenida Don Tulio, Mérida, Venezuela.
2. Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, España.
fannyn@ula.ve

Resumen: En este trabajo, se ha estudiado el efecto que tienen los tratamientos térmicos en la desnaturalización de la proteína Ara h1, una de las proteínas más alergénicas del cacahuete. Previamente, la proteína Ara h1 se aisló del cacahuete crudo mediante precipitación con sulfato amónico y técnicas cromatográficas. Se han obtenido antisueros frente a la proteína Ara h1 mediante inoculación en conejos y los anticuerpos específicos se han aislado por inmunoadsorción, se han conjugado con peroxidasa y se han utilizado para desarrollar una técnica de ELISA en placa de tipo sándwich. La desnaturalización de la proteína Ara h1 se ha estimado midiendo la pérdida de inmunorreactividad mediante la técnica de ELISA. Los parámetros cinéticos y termodinámicos se han determinado en un intervalo de temperaturas de 82-90 ºC. Los resultados obtenidos indican que la desnaturalización de la proteína Ara h1 sigue un orden de reacción de n = 1,5. La desnaturalización térmica de la proteína Ara h1 se ha estudiado también mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando diversas rampas de calentamiento, obteniéndose una temperatura del máximo del pico endotérmico de 90,2 ºC y una entalpía de desnaturalización de 1574 kJ/mol.

Palabras clave: Proteína Ara h1, cacahuete, termorresistencia, inmunorreactividad, Calorimetría Diferencial de Barrido.

Abstract: The effect of heat treatment on denaturation of Ara h1 protein, a major allergen from peanut, was studied using several techniques. Previously, the protein was isolated from raw peanut using ammonium sulphate precipitation and chromatographic techniques. Antisera against Ara h1 protein was obtained in rabbits and specific antibodies were isolated by immunoadsorcion, conjugated with horseradish peroxidase and used to develop a sandwich ELISA technique. Denaturation of Ara h1 protein was measured by the loss of reactivity with its specific antibodies using the ELISA technique. Kinetic and thermodynamic parameters were determined over a temperature range of 82-90 ºC. Results obtained showed that denaturation of Ara h1 follows a reaction order of n = 1.5. Thermal denaturation of Ara h1 protein was also studied by Differential Scanning Calorimetry (DSC) using several heating rates, obtaining a maximum peak temperature of denaturation of 90.2 ºC and a denaturation enthalpy of 1574 kJ/mol.

Keywords: Ara h1 protein, peanut, thermorresistance, immunorreactivity, Differential Scanning Calorimetry.

INTRODUCCIÓN

El cacahuete (*Arachis hypogaea*) es el causante de un alto porcentaje de los casos de alergias alimentarias, y su prevalencia se ha incrementado considerablemente en los últimos años. Actualmente, se estima que el 13% de las alergias alimentarias en niños y el 16% en adultos son debidas al cacahuete (Tariq *et al.* 1996). Además, es necesario resaltar que la alergia al cacahuete suele persistir de por vida y que consumido a una dosis muy baja es capaz de desencadenar un cuadro clínico en individuos con una alta sensibilidad, que puede llegar a tener unas consecuencias graves, ya que aproximadamente un 20% de las reacciones alérgicas a cacahuete llega a desencadenar una reacción anafiláctica (Al-Muhsen *et al.* 2003).

Los cacahuetes se consumen ampliamente como aperitivos tras ser sometidos a procesos de fritura o tostado, y también pueden ser usados como ingredientes en muchos alimentos como chocolate, productos de repostería y confitería, etc. Por ello, es posible que trazas de cacahuete se encuentren en alimentos procesados que no lo deberían contener, debido a problemas de contaminación cruzada en la industria alimentaria (Wen *et al*. 2007).

En el cacahuete, se han identificado hasta ocho proteínas con capacidad alergénica (denominadas desde la Ara h1 a la Ara h8). La proteína Ara h1 es una proteína mayoritaria del cacahuete, ya que constituye entre el 12 y el 16% del contenido total de proteínas de la semilla. Es una glicoproteína de la familia de las vicilinas, que tiene un peso molecular de 63,5 kDa y el punto isoeléctrico es 4,5 (Burks *et al.* 1998). Se encuentra en el cacahuete en forma trímera, que es estable en presencia de 1,8 M NaCl, lo que indica que los monómeros se unen fundamentalmente por interacciones hidrofóbicas (Maleki *et al.* 2000b). La frecuencia de sensibilización de la proteína Ara h1 es muy alta, ya que se ha estimado que entre un 65 y un 100% de los individuos alérgicos a cacahuete presentan IgE específicas frente a ella (Wen *et al.* 2007). Se han identificado hasta 23 epítopos lineales en la proteína Ara h1 que interactúan con las IgE de los individuos alérgicos. Aunque estos epítopos se distribuyen a lo largo de la secuencia de la proteína, la mayoría de ellos se encuentran en las zonas de interacción entre los monómeros. Esta localización parece ser la razón por la que la proteína Ara h1 conserva su alergenicidad tras ser sometida a tratamientos térmicos o de proteólisis con enzimas digestivas tales como la pepsina, tripsina y quimotripsina (Maleki *et al.* 2000a, 2000b).
Se han publicados numerosos trabajos en los que se ha indicado que la alergenicidad de la proteína Ara h1, determinada como la interacción de la proteína con IgE procedentes de individuos alérgicos a cacahuete, se mantiene (Kopelman *et al*. 1999, Nordlee *et al.*1981, Besler *et al.* 2001, Burks *et al.* 1998) e incluso aumenta (Maleki *et al.* 2000a) tras someter a los cacahuetes a diferentes tratamientos de procesado, como tostado, fritura o hervido. Sin embargo, existe muy poca información sobre el efecto que los tratamientos térmicos tienen sobre la desnaturalización de la proteína Ara h1 a un nivel molecular. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto de los tratamientos térmicos en la proteína Ara h1 y determinar los parámetros cinéticos y termodinámicos de su desnaturalización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Purificación de la proteína Ara h1

La proteína Ara h1 se purificó a partir de un extracto de cacahuete crudo utilizando técnicas de precipitación salina y cromatográficas. El extracto se sometió a una precipitación con sulfato amónico entre 60 y 80% de saturación. Después, el extracto obtenido se filtró y se aplicó en una columna de filtración en gel Sephacryl S-200. La fracción enriquecida en la proteína Ara h1 se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en una columna de Sepharose Q y las proteínas retenidas, entre las que se encontraba la proteína Ara h1, se eluyeron con un gradiente lineal de 0 a 600 mM de NaCl. Las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

Aislamiento y conjugación de los anticuerpos anti-Ara h1

La proteína Ara h1 purificada se utilizó como inmunógeno para obtener antisueros en conejos, como se describe en Wehbi *et al*. (2005). Los anticuerpos anti-proteína Ara h1, se aislaron de los antisueros mediante inmunoadsorción utilizando una columna de Sepharose 4B que contenía insolubilizada la proteína Ara h1. Los anticuerpos purificados se conjugaron con peroxidasa de rábano (HRP) utilizando el método de periodato (Catty y Raykundalia 1989).

Técnica de ELISA de tipo sándwich

Esta técnica se ha usado para determinar la concentración de proteína Ara h1 inmunoreactiva que queda tras los tratamientos térmicos. Para ello, los pocillos de las placas se tapizaron con anticuerpos anti-proteína Ara h1 en tampón carbonato sódico 50 mM, pH 9,6. Después, los pocillos se lavaron y se incubaron con ovoalbúmina para bloquear los sitios de unión de proteínas residuales. Para realizar el ensayo, un volumen de 100 µL de los estándares de proteína Ara h1 o de las muestras problema se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, las placas se lavaron y se incubaron con 100 µL de una solución de los anticuerpos anti-proteína Ara h1 marcados con peroxidasa. Tras lavar las placas, se incubaron con un sustrato de la peroxidasa que contenía 3,3 ', 5,5' tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente, la reacción enzimática se detuvo mediante la adición de H_2SO_4, y la absorbancia de los pocillos se determinó a 450 nm utilizando un lector de microplacas (Multiskan Labsystem, Helsinki, Finlandia)

Tratamiento térmico en tubos capilares

La proteína Ara h1 (200 µg/mL) disuelta en tampón fosfato 15 mM, 140 mM NaCl pH 7,4 (PBS) se introdujo en tubos capilares de vidrio y tras sellarlos, se introdujeron en un baño termostático y se trataron a diferentes temperaturas. Los capilares se extrajeron del baño a diferentes tiempos y se enfriaron

inmediatamente por inmersión en un baño de agua con hielo. Tras realizar las diluciones adecuadas, las muestras se analizaron por la técnica de ELISA descrita anteriormente.

Análisis cinético y termodinámico. El proceso de desnaturalización de la proteína Ara h1 puede describirse con la ecuación general de velocidad de reacción:

$$-dc/dt = kc^n \quad (1)$$

donde -dc/dt representa la velocidad de reacción de la desnaturalización de la proteína, k la constante de desnaturalización, c la concentración de proteína a cada tiempo y n el orden de reacción.

Cuando se integra laEc. 1 para un orden de reacción de n = 1, resulta:

$$\ln (c_t /c_0) = -kt \quad (2)$$

donde c_0 es la concentración inicial de proteína (para tiempo t = 0) y c_t la concentración de la proteína desnaturalizada a cada tiempo analizado.

Para un orden de reacción $n \neq 1$, cuando la Ec. 1 se integra, resulta:

$$(c_t /c_0)^{1-n} = 1 + (n-1)\, k\, (c_0)^{n-1} t \quad (3)$$

Para determinar los valores de n y k, se utilizó el criterio de los mínimos cuadrados mediante la función Solver del paquete Excel 5.0 (Microsoft, Seattle, WA). Para verificar el modelo, se determinaron los coeficientes de correlación (r^2) y los valores del error cuadrático medio (RMSE) entre los valores calculados y los valores experimentales obtenidos (Baranyi *et al.*1999).

La temperatura y la constante de desnaturalización están relacionadas de acuerdo a la ecuación de Arrhenius:

$$k = A\, e^{-E}A^{/R.T} \quad (4)$$

donde k representa la constante de velocidad para el proceso de desnaturalización, A la constante de Arrhenius, E_A la energía de activación aparente, R la constante universal de los gases y T la temperatura absoluta. Tomando logaritmos neperianos, se obtiene:

$$\ln k = \ln A - (E_A/R)\,(1/T) \quad (5)$$

Cuando el logaritmo natural de la constante de desnaturalización frente al inverso de la temperatura absoluta se representa de acuerdo a la expresión (5), se obtiene una recta a partir de cuya pendiente es posible hallar el valor de la energía de activación E_A. Igualmente, se puede obtener la constante de Arrhenius de la ordenada en el origen ln A. Conocidos estos dos valores, se pueden calcular los parámetros termodinámicos de la variación de la entalpía ($\Delta H^{\#}$), de la entropía ($\Delta S^{\#}$), y de la energía libre de activación ($\Delta G^{\#}$) (Wehbi *et al.* 2005).

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Se prepararon **s**oluciones de la proteína Ara h1 a una concentración de 100 mg/mL en PBS. Los análisis se realizaron en un calorímetro DuPont modelo DSC 10 (Neumors, Alemania) utilizando el programa Analyst 2000 Thermal Systems. La temperatura inicial fue de 35 ºC y el calentamiento se realizó utilizando rampas de temperatura de 3, 5, 10, 15 y 20 ºC/minuto hasta110 ºC. A partir de los termogramas se obtuvieron los siguientes parámetros: temperatura inicial de desnaturalización (Ti), temperatura del máximo del pico endotérmico (Tp) y entalpía aparente de desnaturalización (ΔHap). La entalpía de Van´tHoff (ΔH_{VH}) se calculó a partir de la temperatura del máximo del pico endotérmico (Tp) y la anchura del pico a la mitad de su altura (ΔT1/2) como se describe en Puyol *et al*. (1994).La energía de activación (Ea) del proceso de desnaturalización de la proteína Ara h1 se calculó mediante el método de Kissinger (1957).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo, se ha estudiado el efecto que tienen los tratamientos térmicos en la desnaturalización de la proteína Ara h1, determinando la pérdida de su reactividad con anticuerpos específicos utilizando una técnica de ELISA tipo sándwich. Esta técnica ha resultado ser lineal en un intervalo de concentraciones entre 20 y 400 ng/mL (r^2> 0,98).

Previamente, se realizaron unos experimentos para determinar el rango de temperaturas apropiado para estudiar la desnaturalización de la proteína Ara h1, que resultó ser de entre 82 y 90 ºC.

La disminución de la concentración deproteína Ara h1 inmunorreactiva aumentó para cada temperatura con el tiempo de tratamiento. Los datos experimentales obtenidos en este trabajo se analizaron utilizando las Ecs.

2 y 3 para determinar tanto la constante de velocidad (*k*) como el orden de reacción (*n*) de la desnaturalización de dicha proteína. Utilizando dichas ecuaciones, los valores *n* obtenidos variaron entre 1,3 y 1,7 (resultados no mostrados). Como la comparación de los valores *k* sólo es posible para un mismo orden de reacción, se calculó el valor medio de *n* que resultó ser de 1,5. A continuación, los resultados experimentales se analizaron de nuevo teniendo en cuenta ese orden de reacción (Tabla 1). Los valores de los coeficientes de correlación (r^2) fueron superiores a 0,909, y los valores del error cuadrático medio (RMSE) fueron inferiores a 0,0578. Además, al calcular la correlación entre las concentraciones determinadas experimentalmente y las calculadasa todas las temperaturas usando ese orden de reacción fue de 0,974 (Figura 1). Estos resultados indican que el orden de reacción de 1,5 es adecuado para describir el proceso de desnaturalización térmica de la proteína Ara h1.

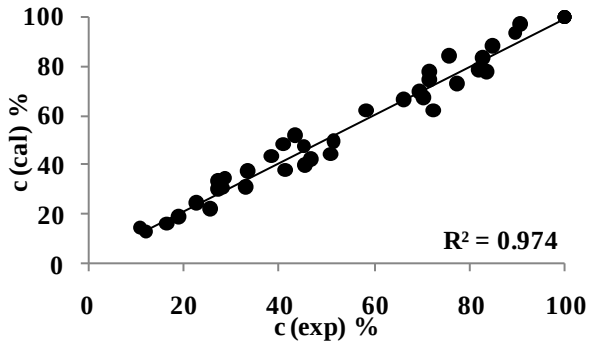


Figura 1: Correlación entre los valores de concentración experimentales (exp) y los calculados (cal) para la proteína Ara h1 tratada térmicamente asumiendo un orden de reacción n = 1,5. c es la concentración de proteína inmunorreactiva a cada tiempo de tratamiento expresada como porcentaje de la concentración de proteína de la muestra no tratada. R^2, es el coeficiente de correlación.

La representación gráfica del logaritmo de la constante de velocidad frente a la inversa de la temperatura (Figura 2) dio una relación lineal en el intervalo de temperaturas estudiado (r^2 = 0,96). A partir de la pendiente de esta gráfica se cálculo el valor de la energía de activación, que fue de 735,28 kJ/mol. El elevado valor de la energía de activación obtenido para la proteína Ara h1 indica que durante la desnaturalización, tiene lugar la ruptura de un gran número de enlaces de baja energía.

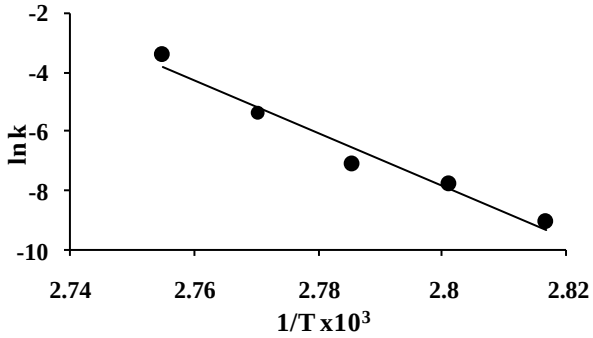


Figura 2. Variación de la constante de velocidad (*k*) con el inverso de la temperatura absoluta para el proceso de desnaturalización de la proteína Ara h1 para un orden de reacción de *n* = 1,5.

Por otra parte, los valores obtenidos para los parámetros termodinámicos de la desnaturalización de la proteína Ara h1 fueron similares en todas las temperaturas estudiadas (Tabla 1). El valor de la variación de la entalpía de activación estimada para la proteína Ara h1 ha sido elevado, aproximadamente de 735,28 kJ/mol, lo que sugiere que la proteína sufre un cambio conformacional considerable durante su desnaturalización térmica. La variación de la entropía de activación ha dado valores positivos, lo que indica que no existe un proceso significativo de agregación.

Tabla 1. Parámetros cinéticos y termodinámicos de la desnaturalización de la proteína Ara h1 para un orden de reacción de n = 1,5.

T (°C)	k (x10^4)(s^{-1})	r^2	ECM	$\Delta H^{\#}$ (KJ/mol)	$\Delta S^{\#}$ (KJ/mol·K)	$\Delta G^{\#}$ (KJ/mol)
82	1,14	0,921	0,0345	732,23	1,7471	112,02
84	4,15	0,910	0,0513	732,22	1,7470	108,52
86	7,90	0,974	0,0394	732,19	1,7470	105,03
88	47,83	0,970	0,0578	732,18	1,7469	101,53
90	322,50	0,909	0,0406	732,16	1,7469	98,05
				E_a= 735,28 kJ mol^{-1}		

k: constante de velocidad, r^2: coeficiente de correlación, ECM: error cuadrático medio, $\Delta H^{\#}$: variación de entalpía de activación, $\Delta S^{\#}$: variación de entropía de activación, $\Delta G^{\#}$: variación de energía libre de activación, E_a: energía de activación

Los resultados obtenidos en este trabajo difieren de los obtenidos por otros autores que estudiaron el efecto del tratamiento térmico en la alergenicidad de la proteína Ara h1. Así, en el estudio realizado por Koppelman *et al.* (1999), con la proteína purificada a partir de cacahuete, que previamente había sido horneado a temperaturas entre 50 y 140 ºC durante 15 minutos, estos autores observaron que la proteína Ara h1 no experimentó una disminución de su reactividad con las IgE del suero de pacientes alérgicos a cacahuete usando una técnica de ELISA en placa. Resultados similares se han obtenido al estudiar la reactividad de extractos de cacahuete, que habían sido sometido a procesos de fritura y tostado, con IgE del suero de alérgicos a cacahuete usando una técnica de inmunoblotting (Beyer *et al.* 2001). Estos hechos se han atribuido a que los epítopos que reaccionan con las IgE parecen estar situados fundamentalmente en las zonas hidrofóbicas de interacción entre los monómeros, y por lo tanto el contacto entre los monómeros los protege frente a la desnaturalización (Shin *et al.* 1998). Sin embargo, la pérdida de inmunoreactividad observada en nuestro trabajo indica que una buena parte de los epítopos reconocidos por las IgG del conejo son conformacionales y sufren cambios en su estructura durante el calentamiento de la proteína. Además, las muestras tratadas en nuestro trabajo estaban constituidas por soluciones acuosas de proteína purificada, mientras que en los trabajos previos publicados, el tratamiento se había realizado en el cacahuete entero, lo que sugiere que los componentes presentes en la semilla y las condiciones de tratamiento influyen en la desnaturalización de la proteína Ara h1.

Por otra parte, el análisis de la proteína Ara h1 realizado mediante la técnica DSC indica que la temperatura máxima del pico endotérmico de desnaturalización aumenta con la velocidad de calentamiento, mientras que la entalpía de activación no varía sustancialmente en esas condiciones. Los valores del máximo del pico y de la entalpía de desnaturalización, obtenidos al extrapolar la velocidad de calentamiento a 0 °C/min han sido de 90,22 ºC y 1574,2 kJ/mol, respectivamente (Tabla 2).

El máximo del pico endotérmico estimado en este trabajo es ligeramente superior al indicado por Koppelman *et al*. (1999) de 87 ºC. Sin embargo, la entalpía de desnaturalización obtenida en nuestro trabajo es considerablemente mayor que la obtenida por dichos autores, lo que podría deberse a que al realizar los cálculos, nosotros consideramos el peso molecular de la proteína en su forma trímera.

La relación entre el cambio de la entalpía de desnaturalización obtenida del termograma y la entalpía de Van't Hoff (ΔHapp: ΔH_{VH}) ha dado en todos los casos un valor superior a 1, lo que es común en aquellas proteínas cuya estructura incluye varios dominios o monómeros (Privalov 1982), como es el caso de la proteína Ara h1. La energía de activación para la desnaturalización térmica de la proteína Ara h1 se ha calculado por el método de Kissinger (1957) (Figura 3) obteniéndose un valor de 400,12 kJ/mol, similar al de otras proteínas globulares alimentarias (Sánchez *et al.* 1992, Puyol *et al.* 1994).

Tabla 2: Parámetros termodinámicos de la desnaturalización de la proteína Ara h1 a diferentes velocidades de calentamiento y extrapolados a 0 ºC/min.

Heating rate (ºC /min)	**T_i (ºC)**	**T_p (ºC)**	**ΔH_{ap}(KJ/mol)**	**ΔH_{VH}(KJ/mol)**	**$\Delta H_{ap}/\Delta H_{VH}$**
0	70,19	90,22	1574		
3	88,27 ±0,76	90,84±0,30	1525 ± 112	1154 ±118	1,05 ±0,49
5	87,37 ±1,06	91,81±0,43	1410 ±125	952 ±101	1,42 ±0,33
10	89,48 ±0,11	93,56±0,13	1500 ±122	960 ±28	1,56 ±0,11
15	90,50 ±0,10	94,58±0,04	1004 ±159	817 ±45	1,16 ±0,12
20	91,44 ±0,52	96,12±0,45	1219 ±182	620 ±42	1,94 ±0,21
E_a= 401,12 kJ mol^{-1}					

T_i: Temperatura de inicio de la desnaturalización, T_p: Temperatura del máximo del pico endotérmico, ΔH_{ap}: Variación de la entalpía de desnaturalización aparente, ΔH_{VH}: Variación de la entalpía de Van't Hoff. Los valores corresponden a la media ± DE de al menos cuatro repeticiones

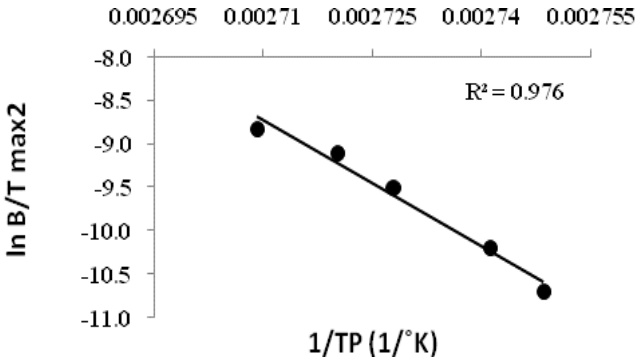


Figura 3: Representación de Kissinger para la desnaturalización de la proteína Ara h1.T_{max} es la temperatura del máximo pico endotérmico (º Kelvin) y β es la velocidad de calentamiento.

CONCLUSIONES

El proceso cinético de desnaturalización de la proteína Ara h1, entendido como la pérdida de la capacidad de la proteína de ser reconocida por sus anticuerpos específicos, se ve favorecido al aumentar la temperatura y el tiempo de tratamiento, y sigue un orden de reacción aparente de n = 1,5.

Los altos valores del incremento en la entalpía de activación y los valores positivos de la entropía de activación determinados para el proceso de pérdida de inmunoreactividad de la proteína Ara h1, al ser tratada térmicamente, indican que, durante la desnaturalización, los procesos de desplegamiento predominan sobre los de agregación en el rango de temperaturas estudiado.

Los parámetros termodinámicos de desnaturalización de la proteína Ara h1 obtenidos por la técnica de calorimetría diferencial de barrido indican que la proteína sufre un cambio de conformación considerable cuando es tratada térmicamente.

BIBLIOGRAFÍA

Al-Muhsen S, Clarke AE, Kagan RS. 2003 Peanut allergy: an overview. Canadian Medical Association or its licensors, 168: 1279-1285.

Baranyi J, Pi C, Ross T. 1999. Validating and comparing predictive models. International Journal of Food Microbiology, 48: 159-156.

Besler M, Steinhart H, Paschlke M. 2001. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. Journal of Chromatography B, 756: 207-228.

Beyer K, Morrow E, Li XM, Bardina L, Bannon GA, Burks AW, Sampson HD. 2001. Effects of cooking methods on peanut allergenicity. Journal of Allergy and Clinical Inmunology, 107: 1077-1081.

Burks W, Sampson HA, Bannon GA. 1998. Peanut Allergens. Allergy, 53: 725-730.

Catty D, Raykundalia C.1989. ELISA and related enzyme immunoassay. En Catty D editor. Antibodies: a partial approach. Vol II. Oxford: IRL Press. pag 97-154.
Kissinger HE. 1957. Reaction kinetics in differential thermal analysis. Analytical Chemistry, 29: 1702-1706.
Kopelman SJ, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Hessing M, de Jongh HHJ. 1999. Heat-induced conformational changes of Ara h1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties. The Journal of Biological Chemistry, 274: 4770-4777.
Maleki SJ, Chung SY, Champagne ET, Raufman JP. 2000a. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins.Journal of Allergy Clinical Inmunology, 106: 763-768.
Maleki S J, Kopper RA, Shin DS, Park C-W, Compadre CM, Sampson H, Burks AW, Bannon GA. 2000b. Structure of the Major Peanut Allergen Ara h1 May Protect IgE-Binding Epitopes from Degradation. The American Association of Immunologists, 164: 5844-5849.
Nordlee JA, Taylor SL, Jones RT, Yunginger JW. 1981. Allergenicity of various peanut products as determined by RAST inhibition. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 68: 376-382.
Privalov PL. 1982. Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system. Advances in Protein Chemistry, 35: 1-104. (18)
Puyol P, Pérez MD, Peiró JM, Calvo M. 1994. Effect of binding of retinol and palmitic acid to bovine β-Lactoglobulin on its resistance to thermal denaturation. Journal of Dairy Science, 77: 1494-1502.
Sánchez L, Peiró JM, Castillo H, Pérez MD, Ena JM, Calvo M. 1992. Kinétic parameters for denaturation of bovine milk lactofrrin. Journal of Food Science, 57: 873 – 879.
Shin DS, Compadre CM, Maleki SJ, Kopper RA, Sampson H, Huang SK, Burks AW, Bannon GA. 1998. Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on Ara h1, an abundant and highly allergic peanut protein. The Journal of Biological Chemistry, 273: 13763-13760.
Tariq SM, Stevens M, Matthews S, Ridout S, Twiselton R, Hide DW. 1996. Cohort study of peanut and tree nut sensitisation by age of 4 years. British Medical Journal, 313: 514–517.
Wehbi Z, Pérez MD, Sánchez L, Pocoví C, Barbana C, Calvo M. 2005. Effect of heat treatment on denaturation of bovine □-lactalbumin: determination of kinetic and thermodynamic parameters. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 9730-9736.
Wen H-W, Borejsza-Wysocki B, De Cory TR, Durst RA. 2007. Peanut allergy, peanut allergens, and methods for the detection of peanut contamination in food products. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,6: 47-58.

AGRADECIMIENTOS
Este trabajo se ha realizado con la financiación del proyecto P10078/09 concedido por el Gobierno de Aragón. Mercedes Montserrat es becaria (Ref. 44692/09) del Gobierno de Aragón.

Diseño e implementación de un Plan HACCP para la producción de manteca salada en envases individuales de 10 g.

Nigro J.A. [1], Bertero J.M.[1], Marín M.A. [1,2]

1: Ing. Química. Fac. de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.
2: Área Gestión, Calidad y Ambiente. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos- FCEFyN-UNC.

Resumen: El objetivo del trabajo fue desarrollar el plan HACCP para el proceso de producción de manteca con sal en envases individuales de 10 g en un establecimiento de la provincia de Córdoba (Argentina) según IRAM-NM 323:2010 Sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP). Se realizó el relevamiento de la planta y del proceso de elaboración. Se definió como alcance del plan de HACCP desde la recepción de la leche cruda hasta el almacenamiento del producto terminado. El equipo HACCP identificó los puntos críticos de control (PCC) en las etapas de recepción; pasteurización; inoculación y maduración y, batido, amasado y salado. La validación del plan HACCP permitió demostrar que la combinación de las medidas de control, programas de prerrequisitos, prerrequisitos operacionales y plan HACCP son efectivas. El registro del análisis de peligros y el registro de control del plan HACCP constituyen los documentos clave para la verificación y revisión del plan y son la base para la mejora continua del sistema

Palabras clave: inocuidad, manteca con sal, HACCP, producción de manteca, envases individuales.

Abstract: The objective was to develop an HACCP plan for the production process of butter with salt in 10 g individual packages in an establishment of the province of Córdoba (Argentina) in concordance with IRAM-NM 323:2010 Hazard Analysis and Critical Control Points System (HACCP). A diagnosis of the plant and process was conducted. The scope of the HACCP plan covered from reception of raw milk to finished product storage. HACCP team identified the following operations as critical control points (PCC): reception of raw milk; pasteurization; inoculation and ripening and churning, kneading and salty. The HACCP plan validation showed that the combination of control measures, prerequisite programs, operational prerequisites and HACCP plan are effective. The record of the hazard analysis and the record to monitor HACCP plan are key documents for verification and revision of the plan and are fundamental for continuous improvement.

Keywords: food safety, salted butter, HACCP, production of butter, individual packages.

INTRODUCCIÓN

En el mercado global, el grado de exigencia de clientes y consumidores respecto de la calidad de los alimentos, se ha elevado y diversificado. En este marco cobran relevancia atributos como el origen y los sistemas y procesos de producción que redundan en una mayor calidad, inocuidad y posibilidad de identificar cada una de las etapas del proceso de producción de un alimento (FAO/OMS, 2005). La inocuidad, en particular, es un valor innegociable, por lo que la implementación de sistemas de gestión de la inocuidad ha sido establecida como uno de los pilares de las transacciones comerciales de alimentos (Trienekens J, Zuurbieri P. 2008). En este contexto el enfoque preventivo del sistema HACCP ha demostrado su eficacia cuando su implementación se realiza de acuerdo a las etapas de la "secuencia lógica" adoptada por las legislaciones y normativas internacionales. El sistema de HACCP ha logrado el mayor grado de evolución, aceptación y aplicación a nivel internacional por diversas organizaciones, empresas y gobiernos ya que garantiza la inocuidad en todos y cada uno de los eslabones de la cadena de valor de la producción de alimentos y está incorporado en todas las normas vigentes de gestión de la inocuidad de los alimentos.

Podemos definir a la Manteca como: "el producto graso obtenido exclusivamente por el batido y amasado, con o sin modificación biológica, de la crema pasteurizada derivada exclusivamente de la leche, por procesos tecnológicamente adecuados. La materia grasa de la manteca deberá estar compuesta exclusivamente de grasa láctea" (CAA, 2012). Así, la manteca es un derivado lácteo que se utiliza ya en consumo directo o como ingrediente en la elaboración de alimentos. La transformación de la crema de leche en manteca consiste en la separación mecánica de la grasa emulsionada presente en la crema de leche, seguido de un proceso de maduración que genera los compuestos de aroma y sabor.

Técnicamente, podemos afirmar que la manteca es una emulsión del tipo agua en aceite, obtenida por batido de la crema, y que para el caso particular de la manteca salada contiene no menos del 80% de materia grasa y no más del 16% de agua. Las etapas para la producción de manteca son: recepción de leche cruda en usina láctea, filtración, precalentamiento, descremado, normalización, neutralización, homogenización, pasteurización, desodorización, maduración, batido, amasado y salado, desuerado y lavado, moldeado, envasado y empaquetado (Early, 1998).
La inocuidad de la manteca depende de la inocuidad y de las condiciones de recepción de la leche cruda, del comportamiento del inóculo y las condiciones de maduración y de la contaminación durante el proceso por equipos u operarios.
El objetivo de este trabajo fue desarrollar un plan HACCP en el proceso de producción de manteca con sal en envases individuales de 10 g en un establecimiento de la provincia de Córdoba (Argentina). El plan HACCP abarcó desde la recepción de la leche cruda hasta el almacenamiento del producto terminado.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Se realizó un relevamiento de la planta y del proceso de elaboración en un establecimiento productor de la provincia de Córdoba para identificar las operaciones.
2) Se evaluó el grado de cumplimiento con los programas de prerrequisitos (PPR) y prerrequisitos operativos (PPRo) asi como con los requisitos establecidos como responsabilidad de la alta dirección con una lista de verificación diseñada para tal fin conforme la norma MERCOSUR IRAM-NM 323:2010.
3) Se cumplimento con los requisitos establecidos en la norma IRAM-ISO 323:2010 para el diseño e implementación del sistema HACCP.
4) De acuerdo a los principios del HACCP se identificaron las operaciones, se analizaron los peligros biológicos, químicos y físicos en cada etapa del proceso para establecer cuáles son significativos para la inocuidad, se determinaron los Puntos Críticos de Control (PCC), se fijaron los límites críticos (LC) y se definieron los procedimientos para el seguimiento y las correcciones y acciones correctivas a tomar en caso de desvío a los límites críticos.
5) Se redactaron y establecieron los documentos y registros pertinentes.
6) Se establecieron los procedimientos para la gestión de la inocuidad, su auditoria y plan de mejora.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El relevamiento del establecimiento y la auditoria de los programas de prerrequisitos, PPR y PPRoperativos, y del apartado de responsabilidad de la alta dirección determinaron un grado de cumplimiento del 90% de los requisitos establecidos como se muestra en la **Figura 1**, lo cual se considero como satisfactorio para el diseño, desarrollo e implementación del HACCP. Los hallazgos se clasificaron en no conformidades, observaciones y conformidad y se estableció como objetivo un mínimo de 80% de conformidades, hasta un 14% de observaciones y un máximo de 6% de no conformidades.

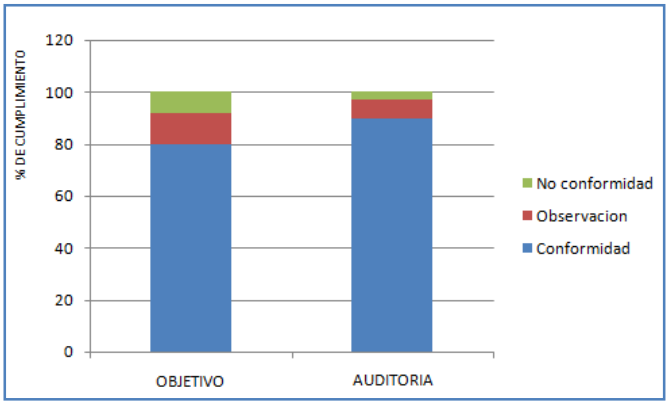


Figura 1: Grado de cumplimiento hallado en la auditoria inicial de los programas de prerrequisitos, PPR y PPRoperativos, y del apartado de responsabilidad de la alta dirección

El cumplimiento de las cinco etapas previas a la aplicación de los principios del HACCP permitió formar el equipo multidisciplinario que condujo el análisis de peligros, definir el producto incluyendo el uso previsto del mismo, y sintetizar el proceso en el diagrama de flujo confirmado que se muestra como parte de la **tabla**

1. Las operaciones batido, amasado, salado, desuerado y lavado ocurren en una mantequera de funcionamiento continuo.
Para la descripción del producto se utilizo el Código Alimentario Argentino (CAA, 2012) y se definió el tamaño, 10 g, y tipo de envase en función de su uso previsto en hoteles y restaurantes.

Tabla 1: Diagrama de flujo confirmado, parámetros de proceso y requisitos de calidad e inocuidad para cada etapa de elaboración de manteca "con sal" en envases individuales de 10 g.

DIAGRAMA DE FLUJO CONFIRMADO	PARAMETROS DE PROCESO; REQUISITOS DE CALIDAD E INOCUIDAD
RECEPCIÓN DE LECHE	T<5 ºC; Acidez: 0,14 a 0,18 g ac. láctico. 100ml^{-1}; Densidad a 15ºC: 1,028-1,034; sólidos no grasos>8,2 g.100 g^{-1}; proteínas totales>2,9 g.100g^{-1}; T cong. < - 0,512 ºC; Alcohol test: estable; test de ebullición: estable.
PRECALENTAMIENTO	T: 58°C
DESCREMADO	pH: 6,6-6,7
NORMALIZACIÓN	40% de grasa
PASTEURIZACIÓN	T: 90 °C; t: 30 s
DESODORIZACIÓN	T: 18-23 °C
INOCULACION/MADURACIÓN	Starters: Streptococcus *cremoris*, S. *lactis y y Leuconostoccitrovorum*: 3 a 5 % en peso; T: 11 °C; t: 12 - 24 horas.
BATIDO, AMASADO Y SALADO	T: 9 ºC; v: 200 r.p.m.; t: 30 - 45 min; sal: >95% de cloruro de sodio, solución saturada, < 2 % en producto final.
DESUERADO Y LAVADO	Detección de metales: Fragmentos metálicos mayores a 0,5 mm
MOLDEADO	
ENVASADO Y ENPAQUETADOS	Folios de aluminio encerados; T <5 ºC
MANTECA	

El diagrama de flujo confirmado se utilizo como guía para el análisis de los peligros físicos, químicos y biológicos que podrían razonablemente esperarse que ocurran en cada paso. Para cada peligro identificado en cada etapa se realizo una evaluación de acuerdo con la posible severidad de los efectos adversos para la salud y la probabilidad de ocurrencia con un modelo bidimensional propuesto por la FAO/OMS y finalmente se determinaron las medidas de control que se consideraron capaces de prevenir, reducir a niveles aceptables o eliminar aquellos peligros que se identificaron como significativos. Para la determinación de los puntos críticos de control (PCC) el equipo de HACCP utilizo el árbol de decisión propuesto por la norma utilizada como de referencia en el Anexo C. El análisis de peligros determinó que los peligros biológicos son los que principalmente afectan la inocuidad del producto final. Todos los documentos generados y los hallazgos del

análisis de peligro y de la determinación de los PCC se conservaron. En la **Tabla 2** se muestra el resumen del análisis de peligros con las etapas que el equipo de HACCP definió como puntos críticos de control.

Tabla 2: Resumen del análisis de peligros en los PCC

Hoja de trabajo para el Análisis de peligros					
Etapa del proceso	Peligros introducidos, controlados o mantenidos en esta etapa	¿Hay algún peligro significativo para la inocuidad del alimento? (Sí / No)	Justificación	¿Qué medidas de control se pueden aplicar para impedir los peligros significativos?	¿Esta etapa es un punto crítico de control? (Sí / No)
Recepción de leche cruda	F: cuerpos Extraños, pelos, arena, etc.	No		Especificaciones de materia prima. Auditorias al productor rural. Selección de proveedores. Control de pH; T; acidez; etc.	Si
	Q: residuos de antibióticos	Si	El consumo de productos lácteos que contienen los antibióticos pueden, en algunos casos, producir graves reacciones alérgicas que pueden resultar en la muerte.		
	B: *Salmonella spp, Listeria spp*	Si	Número elevado de bacterias esporuladas pueden sobrevivir la pasteurización.		
Pasteurización	F: -	No			Si
	Q: -	No			
	B: *Staphylococcus spp, Salmonella spp, Listeria spp*, etc	Si	Presencia de esporas de bacterias patógenas y bacterias vegetativas activas	Tratamiento térmico tiempo / temperatura controlados	
Inoculación y Maduración	Q: restos de agentes desinfectantes, sustancias acidificantes sintéticas	Si	Usados para la limpieza	BPM. POES Para la limpieza y desinfección	Si
	B: *Lactobacillus spp, Streptococcus cremoris*	Si	Contaminación cruzada, Estreptococos lácticos acidificantes (S. *cremoris*) en exceso	BPM Preparado del inóculo. Tiempo, temperatura y pH controlados durante la maduración	
Batido, amasado y Salado	F: restos de metales	Si	Restos de partículas metálicas provenientes del batido		Si
	Q: -	No			
Desuerado y lavado (En mantequera de funcionamiento continuo)	B: *Staphylococcus spp, Salmonella spp, Listeria spp*, etc	Si	Contaminación cruzada	BPM En amasadora	

Para las actividades de seguimiento de los límites críticos (L.C) para cada PCC se diseñó un documento con las especificaciones para cada peligro reducido, eliminado o prevenido en cada etapa del proceso en el cual también se incluyeron las correcciones a realizar en caso de desvíos a los L.C; las actividades de verificación y la documentación específica vinculada, como se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Seguimiento de los PCC, extraído del documento sistema de seguimiento de los limites críticos.

Punto crítico de control-Etapa	LC para cada medida de control	Seguimiento				Corrección	Verificación	Documentos
		¿Qué?	¿Cómo?	¿Frecuencia?	¿Quién?			
PCC1-Recepción	Ausencia de antibióticos	Antibióticos	Certificado del proveedor. Análisis de lote.	Antes de descargar. Mensual	Encargado de la recepción de materia prima. Laboratorista	Rechazo	Revisión diaria de registros del proceso. Análisis de presencia de antibióticos.	Certificado del proveedor. Reg. del proceso. Reg. de ensayos de antibióticos.
PCC2-Pasteurización	T:90 ºC t: 30 s	Temperatura y tiempo	Termómetro indicador y registrador de temperatura. Medidor de tiempo de corte.	Continuo	Operario. Supervisor del proceso	Ajuste de parámetros del equipo. Verificar alarma de aviso de caída de temperatura Evaluación del producto.	Control de pasteurización. Análisis de datos. Verificación semanal del funcionamiento de equipo. Auditoria mensual de registros.Muestreo aleatorio semestral.	Inst. del pasteurizador. Reg. de mediciones. Proc. de correcciones y acciones correctivas (AC) PCC2
PCC3-Inoculación/ maduración	Fermento: máx. 5% T: máx. 11 ºC t: máx. 24 h	Vencimiento y peso. Temperatura y tiempo.	Insp. Visual, balanza. Termómetro y timer.	Operario a cargo	Antes de agregar. Continua para las mediciones	Rechazar fermento vencido o sospechoso. Ajuste, calibración o reemplazo de instrumentos. Segregar hasta liberación.	Verificación diaria de balanza. Análisis de datos semanal. Auditoria mensual de registros. Muestreo aleatorio semestral.	Inst. de pesada y verificación de balanza. Inst. verificación de termómetro. Reg. de lote de producción. Proc. de correcciones y AC PCC3.
PCC4-Batido, amasado, salado. detección de metales	T: máx. 11 ºC Agregado higiénico de ingredientes Fragmentos metálicos mayores a 0,5 mm	Temperatura Higiene de utensilios para pesado. Metales	Termómetro, display Visual, Reactivo de superficie Sensor	Operario a cargo	Continua. Cada adición de ingrediente. Continua	Desechar producto. Ajuste, calibración o reemplazo de instrumentos/ equipos. Segregar hasta liberación.	Verificación diaria de instrumentos y equipos. Análisis de datos semanal. Auditoria mensual de registros. Muestreo aleatorio semestral.	Inst. de agregado de ingredientes. Inst. verificación de sensor y termómetro. Reg. de lote de producción. Proc. de correcciones y AC PCC3.

Donde Reg.: Registro; Inst.: Instructivo y Proc.: Procedimiento

Conforme con el requisito 3.4.11.1 de la Norma IRAM-NM 323:2010 se validaron las medidas de control establecidas y se determinó la eficacia del plan HACCP respecto al control de los peligros significativos aplicados. Esto permitió la implementación del plan.
Asimismo, se establecieron las actividades para el sistema de verificación interno para asegurar que el sistema de seguimiento, las correcciones y los planes de acciones correctivas se aplican de acuerdo a los procedimientos establecidos y se definieron los documentos necesarios para su gestión.
Finalmente se establecieron los procedimientos para la gestión de la inocuidad, su auditoria y plan de mejora, los que incluyeron un plan anual de auditorías de proceso, documentación y PCC y la revisión anual por la dirección.

CONCLUSIONES

La validación del plan HACCP permitió demostrar que la combinación de las medidas de control, programas de prerrequisitos, prerrequisitos operacionales y plan HACCP, es efectiva. El registro del análisis de peligros y el registro de seguimiento del plan HACCP constituyen los documentos clave para la verificación y revisión del plan y son la base para la verificación y mejora continua del sistema.

BIBLIOGRAFÍA

CAC/RCP-1-1969. Codex Alimentarius. International Recommended Code of Hygienic Practice-
Casp A; Abril J. (2003). Procesos de conservación de alimentos. Ed. Mundi-Prensa, Madrid- España
Código alimentario argentino. Ley 18284, Decreto 2126/72, Capítulo VIII. Art. 596. http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_VIII.pdf
Early R. 1998. The Technology of Dairy Products. Blackie Academic & Professional, London.
FAO. 1980. Manual de Elaboración de Mantequilla. Equipo Regional de Fomento y Capacitación en Lechería para América Latina. Santiago, Chile
FAO/WHO guidance to governments on the application of HACCP in small and/or less-development food businesses. www.fao.org/ag/agn/agns/foodcontrol_assurance_en.asp
IRAM-NM 323: 2010 Sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP).
IRAM-NM 324: 2010 Industria de alimentos. Buenas Prácticas de manufactura. Requisitos.
Miyagishima K. 2008. International standards for food safety. ISO Focus. www.iso.org/isofocus
Trienekens J; Zuurbieri P. 2008. Quality and safety standards in the food industry, developments and challenges. International Journal of Production Economics 113, p.107-122.
Tscheuschner H. 2001. Fundamentos de tecnología de los alimentos. Ed Acribia, Zaragosa- España

Production of artisanal *Minas* cheese: evaluation of hygienic and sanitary aspects

Silveira M.F.[1], Sturion G.L.[1], Garavello M.E.P.E.[1], Porto E.[1]

1: ESALQ/USP - University of Sao Paulo - College of Agriculture "Luiz de Queiroz", Piracicaba-SP, Brazil. mayra.silveira@usp.br

Summary: All the producers consider that the raw milk and the climate of the region contribute to the peculiarities of *Canastra* cheese. In 94.4% of the cases, the familiar cheese production is the main income activity. The ripeness has become a defective part of the process – 100% of the farmers commercialize the product after the first day of manufacturing or according to the consumers' preference. According to the microbiological standards established for *Canastra* cheese (*Minas Gerais standards: total coliforms = 5x10^3 MPN.g^{-1}*), all of the samples were in accordance with total coliforms, ranging between 0 and 2.4x10^3 MPN.g^{-1}. The results for *E. coli* showed that 82.3% of the samples (14) were contaminated. Furthermore, 77.7% of the farmers' facilities didn't comply with essential requirements to produce safe food.

Keywords: *Canastra* cheese, coliforms, food safety.

Resumen: Todos los productores consideran la leche cruda y el clima de la región los responsables por las características peculiares del queso *Canastra*. En 94.4% de los casos los productores familiares viven en las propiedades donde producen el queso, que es su principal actividad económica. La maduración es actualmente un punto defectuoso del proceso – 100% de los productores comercializan el producto a partir del primer día de fabricación, o de acuerdo a las preferencias del consumidor. De acuerdo con los estándares microbiológicos del estado de Minas Gerais establecidos para el queso *Canastra* (*coliformes totales = 5x10^3 NMP.g^{-1}*), todas las muestras estaban en conformidad con la legislación, presentando de 0 a 2.4x10^3 NMP.g^{-1}. Los resultados para *E. coli* mostraron que 82.3% (14) de las muestras estaban contaminadas. Además, 77.7% de los establecimientos no cumplían con requisitos básicos para la producción de alimentos seguros.

Palabras clave: queso *Canastra*, coliformes, sanidad alimentaria.

INTRODUCTION

The sustainability of food systems is related to many factors. One of them is the local production of food, which valorizes the community and provides income, encouraging families to remain in the countryside. *Minas Gerais* state (southeastern Brazil) produces artisanal *Minas* cheese, made with three basics ingredients: raw milk, rennet and yeast. The artisanal way of making *Minas* cheese is traditional of some regions of the state, and was considered an immaterial patrimony of Brazil, by the Institute of National Historic and Artistic Patrimony -IPHAN [*Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional - IPHAN*] (IPHAN 2008). Serra da Canastra is one of those regions, where seven cities are responsible to produce nearly 4,500 tons of *Canastra* cheese per year (Almeida & Fernandes 2004), which emphasizes its economic importance to the producers and development of the region.

Since *Canastra* cheese is produced with raw milk, according to a Federal Law, it cannot be sold in the whole country. This law requires the pasteurization of milk before cheese production (Brasil 1996), or the ripening of it for 60 days, a fact that does not occur. Therefore, in 2002, *Minas Gerais* state created a specific law that allows the commercialization of artisanal cheese inside the state (Minas Gerais 2002b). The biggest problem, in this case, is that some of these standards are not reachable for the majority of the producers, like the building of new cheese factories, since they are small-scale producers, producing from two to ten kilos per day (SertãoBras 2011).

Trying to solve those issues, in December of 2011, Normative Instruction nº57 was created [*Instrução Normativa n^o 57 (IN 57)*] by the Ministry of Agriculture Livestock and Food Supply [*Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*], allowing artisanal cheese produced in traditional ways to be ripped for less than 60 days (Brasil 2011). This document requires that the establishment: 1) be certificated as a free from brucellosis and tuberculosis place; 2) have a Mastitis Control Program and perform monthly milk analysis in accredited laboratories; 3) have a Good Manufacturing Practices Program and 4) have potable water. The microbiological quality of the final product is also important, whereas one of the fundamental aspects is to prevent the propagation of pathogens through this kind of food (Prata 2001).

Therefore, the objective of this research was to analyze the cultural, sanitary and microbiological aspects involved in the production of artisanal *Minas* cheese in order to evaluate if technical-scientific values will not distort the cultural values of the production of this food.

MATERIALS AND METHODS

The research was based in the QualiQuanti methodology used by Minayo & Sanches (1993) research. The cultural, sanitary and microbiological aspects were evaluated in establishments located in one of the cities producing *Canastra* cheese.

Interviews

Eighteen *Canastra* cheese producers were interviewed with semi-structured questions. Some of the themes discussed were: 1) Tradition; 2) Familiar income from cheese production and 3) ripening.

Checklist

At the 18 establishments, the cheese production chain, from milking to the final product, was evaluated through a checklist based on the norms related to the production of artisanal cheese (Brazil 2000; Minas Gerais 2002a; IMA 2002a; IMA 2002b; IMA 2002c; Minas Gerais 2011).

Microbiological analysis

When collecting samples for this research, one of the establishments that were evaluated/ interviewed had been closed for unknown reasons. Therefore, the analysis of total coliforms and *Escherichia coli* were done in cheese samples of 17 properties, all of them one day after the manufacture process (no ripeness allowed). The transport was made inside an isothermal box with ice packages. The sampling units were diluted in 225 ml of peptone water and homogenized with a stomacher. Then, the decimal dilutions were inoculated in LST-MUG broth (Lauryl Sulphate Tryptose with 4-methylumbelliferyl-β -D-glucuronide). The tubes were incubated at 35º C for 24-48 hours and the ones that produced gas were exposed to Ultraviolet Light (6 w and λ = 325nm). The tubes that exhibit a bluish fluorescence were considered positive for *E. coli* presence. After that, the positive ones were transferred with an inoculating needle to tubes containing Brilliant Green Bile broth and incubated at 35º C for 24-48 hours. The positive tubes for total coliforms were determined if there was gas present. The results were accomplished by means of MPN procedure, in a three-tube series, according to Konacki & Johnson (2001).

Results and discussion

The first issue discussed during the interviews was Tradition. All of the producers interviewed learned the technique from their parents, grandparents or other relatives. Their age ranges from 26 to 80 years old. The period that their establishments have been producing varies from 4 to 31 years. The gender distribution for each activity also showed a variation:

Table 1: Distribution (in % and number of properties) of the main activities according to gender.

	Men	**Women**	**Both**	**Help of employees**
Milking	72.2 (13)	0.0	27.7 (5)	27.7 (5)
Manufacturing	27.7 (5)	27.7 (5)	44.4 (8)	11.1 (2)

It was noticed that milking is a men's activity. When women participate, men are also with them: the tasks are performed in cooperation. In the manufacturing process there is also a division of tasks, but it can be observed that it is not only a women activity: when the objective is making cheese, the percentage of men and women is the same (27.7%). In most of the cases (44.8%) the husband, the wife and, sometimes, the sons and daughters help at the cheese factory. Meneses (2006) found out, in his qualitative research, that at *Serra da Canastra*, women are, in some of the cities, the main labor force on the production of cheese. According to the author, in the opinion of the husbands, their wives are more careful, dedicated and have more hygiene when manufacturing cheese.

It was observed that 94.4% of the families that produce *Canastra* cheese have the product as their main income activity. In two cases the owners of the farms are not directly involved in the production of the cheese, but only in one case the main sources of income are coffee and cattle instead of cheese.
During the interviews it was noticed that the ripeness, an essential aspect of the traditional *know-how*, has become a defective part of the process, threatening the product's identity and its safety. Since the milk used as primary ingredient is not pasteurized, the critical control point is ripeness, as it avoids the reproduction of pathogenic microorganisms. The Agricultural Institute of Minas Gerais - IMA [*Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA*] recommends that the ripeness lasts 21 days (Portal do Governo de Minas Gerais 2012); however, the farmers commercialize the product after the second day or according to the clients' preference. In 88.9% of the establishments the cheese is sold per kilo. Ripped cheese weights less than fresh cheese; therefore, selling ripped cheese is not profitable. That factor is aggravated when the cheese is transported with no refrigeration, increasing the risk of microbiological contamination. Since 2002, there are regulations that demand the fulfillment of requirements related to food safety. Nevertheless, when the check list was analyzed, 77.7% of the farmers' facilities (14 establishments) didn't comply with more than 50% of the essential requirements to produce safe food.

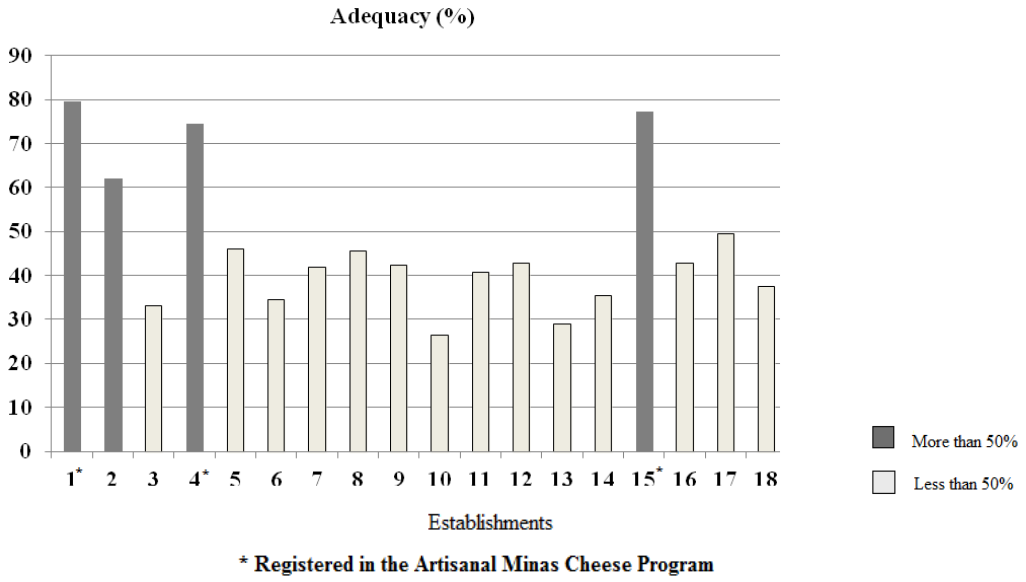


Figure 1: Adequacy percentage of the establishments according to *Minas Gerais* requirements.

It was observed that only in 22.2% (4) of the properties the black mug test (mastitis test) is done every day. Ornelas (2005) visited 132 properties at *Serra da Canastra*, *Alto do Paranaíba*, *Serro* and *Araxá*, and found out that only 45% of the producers performed the test. According to Ornelas (2005), this procedure must be done in all animal individuals and at every milking, since it helps detecting and treating cows with clinical mastitis. If this practice is not performed, the quality of the product can be compromised.
In this research, unconformities like failures on the sanitary control of the cattle, bad hygiene (of the personnel and the environment) during the milking and the manufacturing process, were also noticed. Tuberculosis tests, for example, are performed only on the establishments that are registered in the Artisanal Minas Cheese Program [*Programa Queijo Minas Artesanal*], a program created by the Agricultural Institute of Minas Gerais (IMA) [*Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA*], in partnership with the Technical Assistance and Rural Extension Company of the State of Minas Gerais - EMATER-MG *[Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais* - EMATER-MG*]*. In order to be registered in the program, the establishment must fulfill requirements related to the production process, which involves, for example: equipment, hygiene, health control of the cattle and personnel (Emater 2012). The estimative is that there are around 9,445 producers of artisanal *Minas* cheese in the productive regions (Emater 2012) and, until October 2012, only 232 (2.45%) were registered in the program. (Ima 2012).

Pinto *et al*. (2009) evaluated 33 properties at *Serro* in the state of *Minas Gerais*, a region that produces traditional *Minas* cheese, with the objective of checking the Good Manufacturing Practices. Most of the establishments had insalubrities' focus, like inadequate conditions of the milking pen, bad hygiene of the food handlers, inadequate clothing, among others. The authors classified 19 establishments as inadequate. Table 2 shows the results of the cheese microbiological analysis:

Table 2: Microbiological counting of cheese.

Sample	*E. coli* (MPN.g^{-1})	Total coliforms (MPN.g^{-1})
1	$2{,}4x10^2$	$\geq 2{,}4x10^3$
2	$9{,}3x10^1$	$\geq 2{,}4x10^3$
3	<3	<3
4	9,0	$4{,}6x10^2$
5	9,0	$4{,}3x10^1$
6	<3	$\geq 2{,}4x10^3$
7	$\geq 2{,}4x10^3$	$\geq 2{,}4x10^3$
8	$9{,}3x10^1$	$4{,}6x10^2$
9	$1{,}5x10^2$	$4{,}6x10^2$
10	EXCLUDED	EXCLUDED
11	<3	$2{,}3x10^1$
12	$2{,}3x10^1$	$7{,}5x10^1$
13	$7{,}5x10^1$	$\geq 2{,}4x10^3$
14	$1{,}5x10^2$	$\geq 2{,}4x10^3$
15	4,0	$4{,}3x10^1$
16	$1{,}5x10^1$	$\geq 2{,}4x10^3$
17	4,0	$\geq 2{,}4x10^3$
18	$\geq 2{,}4x10^3$	$\geq 2{,}4x10^3$

Considering that *Minas Gerais* microbiological standards for total coliforms is $5x10^3$ *MPN.g*$^{-1}$, hundred percent of the samples are in accordance with the requirements. On the other hand, in 94.1% (16) of the cheese samples these microorganisms were detected, indicating failures during the process. This research also demonstrated that 82.3% (14) of the samples were contaminated with *E. coli*. Since the *E. coli* is considered an indicator of fecal contamination once it is found in the intestine of hot blood animals (Franco & Landgraf 2005), it means that the raw material or the cheese itself had direct or indirect contact with feces. Ornelas (2005) visited 40 establishments at *Serra da Canastra* and collected 40 samples of cheese with a maximum of 7 days of manufacture to analyze microorganisms as *Listeria monocytogenes*, thermotolerant coliforms and total coliforms. The author detected *Listeria monocytogenes* in one of the samples, while 67.5% (27) and 55.0% (22) of the cheese samples contained total and thermotolerant coliforms above the limit established by the law, respectively. Pereira *et al*. (2008) evaluated the microbiological quality of 28 samples of *Canastra* cheese (raw and ripened), produced at four establishments, and concluded that, for the raw cheese, 08 samples showed results for total coliforms above the limit allowed in the standards. On the other hand, the authors didn't find levels of thermotolerant coliforms above the recommendation. When the analyses were executed in ripened cheese samples, 100% of the samples were in accordance with the standards, showing that the ripening is important to reduce the levels of microorganisms. Dores (2007) collected cheese samples from eight establishments and performed microbiological analysis during a period of 64 days of ripening. The author concluded that the ripening reduce the levels of aerobic mesophyll, total coliforms, *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. After 22 days of ripening, the samples had reduced the pathogenic microbiota considerably.

CONCLUSION

Technical-scientific and cultural values are compatible at the production of this artisanal *Minas* cheese, since there are establishments that follow the majority of the recommendations imposed by the legislation and continue to produce a traditional food product. Since the artisanal way of making *Minas* cheese is a Brazilian immaterial patrimony and the product contributes to the region development and sustainability, its production and commercialization must continue, provided implementing essential hygienic and sanitary procedures. This way, producers will have a chance to compete within the market of high quality cheese. Therefore, it is necessary to guide local producers on measures that contribute to food safety, like adequate ripeness process and Good Manufacturing Practices.

BIBLIOGRAPHY

Almeida EFL, Fernandes MR. 2004. Caracterização da microrregião da Canastra como Produtora do Queijo Minas artesanal. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (Emater-MG). São Roque de Minas, Minas Gerais.

Konacki JL, Johnson JL. 2001. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: APHA (American Public Health Association). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed. Washinton: APHA. Page 69-82.

Brasil. 1996. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília, March 11th, 1996.

Brasil. 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 57, de 15 de dezembro de 2011. Diário Oficial da União, December 16th, 2011.

Dores, MT. 2007. Queijo Minas artesanal da Canastra maturado à temperatura ambiente e sob refrigeração. 103p. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007.

Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER-MG) [www.emater.mg.gov.br]. 2012. Programa Queijo Minas Artesanal [access in 29th October 2012]. Available in: http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_tpl_queijo&id=3299

Franco BDGM & Landgraf M. 2002. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 182p.

Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) [www.ima.mg.gov.br]. 2012. Produtores de Queijo Minas Artesanal. [updated in 17th October 2012; access in 26th October 2012]. Available in: http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/680-produtores-queijo-minas-artesanal-

Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). 2002a. Portaria nº. 523, de 03 de julho de 2002. Dispõe sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e Boas Práticas na Manipulação e Fabricação do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, July 3rd, 2002.

Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). 2002b. Portaria nº. 518, de 14 de junho de 2002. Dispõe sobre Requisitos Básicos das Instalações, Materiais e Equipamentos para a Fabricação do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, June 14th, 2002).

Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). 2002c. Portaria nº. 517, de 14 de junho de 2002. Estabelece Normas de Defesa Sanitária para Rebanhos Fornecedores de Leite para Produção de Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, June 14th, 2002.

Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN). 2008. Ministério da Cultura. Serviço Público Federal. Certidão do Registro do Modo Artesanal de fazer Queijo de Minas, nas Regiões do Serro e nas Serras da Canastra e do Salitre. Departamento do Patrimônio Imaterial do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional, June 13th, 2008.

Meneses JNC. 2006. Queijo Artesanal de Minas: Patrimônio Cultural do Brasil. Dossiê Interpretativo. Ministério da Cultura. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN). Belo Horizonte, 139p.

Minas Gerais. 2002a. Decreto nº 42.645, de 05 de junho de 2002. Aprova o regulamento da Lei n° 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal. Minas Gerais, Diário do executivo, June 5th, 2002.

Minas Gerais. 2002b. Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal e dá outras providências. Minas Gerais, Diário do executivo, February 1st, 2002.

Minas Gerais. 2011. Lei nº 19.492, de 13 de janeiro de 2011. Altera dispositivos da Lei n° 14185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal e dá outras providências. Minas Gerais, Diário do executivo, January 14th, 2011.

Ornelas EA. 2005. Diagnóstico para Caracterização preliminar da Qualidade do Leite, da Água e dos Queijos produzidos na Serra da Canastra. 87p. Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2005

Pereira KC, Sá OR, Pereira KC. 2008. Sanitary-Hygienic quality evaluation of the canastra cheese and its raw material produced in the region of São Roque de Minas (MG). Ciência Et Praxis. 1:21-26.

Pinto MS *et al*. 2009. Segurança Alimentar do Queijo Minas Artesanal do Serro, Minas Gerais, em Função da Adoção de Boas Práticas de Fabricação. Pesquisa Agropecuária Tropical. 39:342-347.

Portal do Governo de Minas Gerais, 2012. Secretaria propõe revisão de normas para o queijo artesanal. Access in 01st November 2012]. Available in: http://www.agricultura.mg.gov.br/noticias/676

Prata LF. 2001. Fundamentos de Ciência do leite. Jaboticabal: Funep. 287p.

SertãoBrás [www.sertaobras.org.br]. 2011. Balde Branco: Lei federal distrata queijo artesanal [updated in 4th August 2011; access in 24th October 2012]. Available in: http://www.sertaobras.org.br/queijo-2/producao/balde-branco-lei-federal-distrata-queijo-artesanal/

ACKNOWLEDGEMENTS

Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES [*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES*].